



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO EM MEDICINA TRANSFUSIONAL DE CANÍDEOS

MARGARIDA ANA MACHADO MARTA DA COSTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutora Graça Maria Alexandre Pires Lopes de Melo

VOGAIS

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Mestre Nuno Manuel Mira Flor dos Santos Félix

ORIENTADOR:

Mestre Nuno Manuel Mira Flor Santos Félix

CO-ORIENTADOR:

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2014
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO EM MEDICINA TRANSFUSIONAL DE CANÍDEOS

MARGARIDA ANA MACHADO MARTA DA COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutora Graça Maria Alexandre Pires Lopes de Melo

VOGAIS

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Mestre Nuno Manuel Mira Flor dos Santos Félix

ORIENTADOR:

Mestre Nuno Manuel Mira Flor Santos Félix

CO-ORIENTADOR:

Dr. Gonçalo Eduardo Vítor Vicente

2014
LISBOA

Ao meu pai...

AGRADECIMENTOS

As minhas primeiras palavras de agradecimento têm de ir forçosamente para a minha mãe. Por todo o apoio incondicional, os sacrifícios, o sentido de responsabilidade que me inculcaste e as oportunidades que me deste ao longo da vida que me transformaram na pessoa que sou hoje.

Bazinha, és a pessoa mais bondosa que conheço, obrigado pela eterna disponibilidade e por sempre acreditares em mim.

Duda, meu sobrinho, és a criança mais especial que existe.

Pedro, és o meu pilar. Obrigado por todo o amor, por me dares confiança quando eu não a tenho, e acima de tudo, pela enorme paciência e compreensão ao longo destes dez anos.

Madrinha e tio Neo, obrigado pela ternura, auxílio, proteção e por sempre me fazeres sentir confortável.

Tia Gena e tio Zé, palavras não conseguem expressar o meu agradecimento, obrigado por todo o carinho e por todas as oportunidades que me concederam.

Ticha e Mimi, minhas princesas, foram vocês a principal causa de querer seguir esta profissão, todas as minhas vitórias vão ser para vocês.

Ao Professor Nuno Félix, por ter aceitado ser meu orientador, por me dar uma enorme oportunidade de estagiar em Lyon e por estar incluída num projeto muito interessante. Não me posso esquecer também de todo o apoio e receptividade que tem demonstrado ao longo neste último ano.

Ao Dr. Gonçalo Vicente por me ter aceitado como estagiária. Pela disponibilidade, amabilidade, espírito crítico, desafios propostos e por tudo que me ensinou que me tornará numa melhor profissional. Foi uma honra trabalhar ao seu lado.

À Prof. Dra Isabelle Goy- Thollot, por me receber com uma enorme gentileza, por todos os seus ensinamentos, disponibilidade, pela oportunidade que me concedeu ao deixar estagiar no SIAMU (Soins Intensifs Anesthésiologie et Médecine d'Urgence) e por fazer parte deste projeto.

A toda a família do hospital escolar FMV-UL, à equipe médica, auxiliares e enfermeiros, por tudo o que me ensinaram, pela paciência e simpatia, fico muito contente por ter tido a oportunidade de conhecer e trabalhar com vocês.

Aos meus amigos próximos, Ana, Borges, Cindy, Miguel (a primeira pessoa que conheci na FMV, que acabou por se tornar num irmão impecável), Mó, Preta, Rita, Sofia, Susana pela amizade, todas as experiências que partilhámos, a ajuda e as gargalhadas.

À grande turma D, pelo companheirismo e espírito de ajuda, tive muita sorte em aprender e crescer ao vosso lado.

RESUMO

A área de medicina transfusional tem sofrido um grande desenvolvimento nas últimas décadas. Atualmente, existe um melhor conhecimento, no que diz respeito às diferenças entre os grupos sanguíneos e aos perigos de reações transfusionais. Em canídeos estas têm maior importância quando o paciente é submetido a uma segunda transfusão, porque nesta espécie, na sua maioria, a existência de aloanticorpos não ocorre naturalmente.

O antígeno DEA 1 é o antígeno com maior antigenicidade e que possui um maior risco de causar reações transfusionais. Recentemente, verificou-se que os tipos sanguíneos DEA 1.2 e 1.3, não são considerados grupos sanguíneos, mas sim uma expressão diferente do mesmo antígeno eritrocitário, o DEA 1.

O objetivo deste estudo foi analisar dois métodos de tipificação, nomeadamente a expressão antigénica pela tira da Alvedia® e com a determinação antigénica pela citometria de fluxo. Através da tira imunocromatográfica, utilizando anticorpos monoclonais, e da citometria de fluxo, foi classificada a expressão antigénica, dos dadores do banco de sangue do SIAMU e de alguns pacientes que receberam transfusões, em 4 categorias com níveis crescentes de intensidade: muito fraca, fraca, normal e forte. A citometria de fluxo recorreu a anticorpos monoclonais anti DEA 1 e a anticorpos anti-ratinho secundários aos quais é acoplado o Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Foram comparados os resultados de ambas as técnicas e houve 100% (N=56) de concordância, relativamente à classificação do tipo sanguíneo através destes dois métodos nos dadores e 87% (N=15) nos recetores. Porém ao analisar-se as intensidades do antígeno DEA 1, nos dadores DEA 1 positivos através dos dois métodos determinaram-se diferenças em 7 animais (FR=23%). Tal diferença pode dever-se facto de a classificação obtida pela citometria de fluxo ser quantitativa, enquanto que a classificação através da tira é semi-quantitativa.

Os pacientes que receberam transfusão foram seguidos durante aproximadamente 6 meses, e reparou-se que, quando o paciente e o dador possuem diferentes expressões do antígeno DEA 1, o recetor irá demonstrar uma população dupla de expressão antigénica indicando que a expressão do antígeno do recetor e dador são conservadas e o paciente irá recuperar a sua expressão antigénica após o desaparecimento dos eritrócitos transfundidos. Também se chegou à conclusão que a transfusão entre canídeos com expressões antigénicas diferentes não induz o aparecimento de aloanticorpos contra DEA 1.

Palavras-chave: transfusão sanguínea, DEA 1, citometria de fluxo, tira imunocromatográfica.

ABSTRACT

The area of transfusion medicine has undergone a tremendous development in recent decades. Currently, there is a better understanding, regarding the differences between blood groups and the risks of transfusion reactions. The latter is specially important when the patient is submitted to a second transfusion, due to the fact that most dogs do not have naturally occurring antibodies. The DEA 1 is the antigen with higher antigenicity and has a higher risk of causing transfusion reactions. Recently, it was discovered that blood types DEA 1.2 and DEA 1.3 were not considered blood groups, but actually, a different expression of the same erythrocyte antigen, the DEA 1.

The aim of this project was to study two blood typing methods, including antigen expression by Alvedia ® strip and antigenic determination by flow cytometry . Through the immunochromatographic strip, using monoclonal antibodies, and flow cytometry, was classified antigen expression SIAMU blood bank donor 's and some patients who received transfusions in 4 categories with increasing levels of intensity: very weak , weak , normal and strong . Flow cytometry used DEA 1 monoclonal antibody and anti-mouse secondary antibody which is coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC).

The results of both techniques were compared and there was 100% (N = 56) concordance relating to the classification of the type of blood through these two methods on the donors and 87% (N=15) on the patients. But by analyzing the intensities of the antigen DEA 1 in donors DEA 1 positive by the two methods there were differences in 7 animals (RR = 23 %) . This difference may be due to the fact that the classification obtained by flow cytometry is quantitative, while the classification using the strip is semi-quantitative.

Patients receiving transfusions were followed for about 6 months, and it was noticed that when both patient and donor have different DEA 1 antigen expression, the receiver will demonstrate a dual population of antigen expression indicating that the expression of the receptor and donor antigen are maintained and the patient will regain their antigen expression after the disappearance of transfused erythrocytes. It was also concluded that transfusion between dogs with different antigenic expression does not induce the appearance of alloantibodies against DEA 1.

Keywords: transfusion, DEA 1, flow cytometry, immunochromatographic strip.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FÓRMULAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
PARTE I- Revisão Bibliográfica.....	1
1.Introdução.....	1
2.Produutos sanguíneos.....	2
2.1. Sangue total (ST).....	3
2.1.1. Sangue total fresco (STF)	3
2.1.2. Sangue total armazenado (STA)	4
2.2. Concentrado de eritrócitos (CE)	4
2.3. Produtos do plasma.....	4
2.3.1. Plasma fresco congelado (PFC)	4
2.3.2. Plasma armazenado congelado (PAC).....	4
2.3.3. Plasma rico em plaquetas (PRP).....	5
2.3.4 Crioprecipitado (Crio).....	5
2.3.5. Criosobrenadante (CrioS)	5
2.4 Concentrado de plaquetas (CP)	6
3. Grupos sanguíneos	6
3.1. Canídeos.....	6
3.1.1. DEA 1	7
3.1.2. DEA 3	9
3.1.3. DEA 4	9
3.1.4. DEA 5	9
3.1.5. DEA 7	10
3.1.6. Novo antigénio Dal.....	10
3.2. Felinos	10
3.2.1. Sistema AB.....	12
3.2.2. Novo antigénio Mik.....	13
4. Tipificação sanguínea	13
4.1. Hemaglutinação e autoaglutinação.....	13
4.2. Tipificação em laboratórios de referência	14
4.3. ID-Gel Test Canine 1.1®, Dia-Med-Vet.....	14
4.4. Testes rápidos realizados nos CAMV	15

4.4.1. RapidVet®-H (Canine DEA 1.1) Agglutination Test Cards, DMS Laboratories, Inc.	15
4.4.2. Quick Test DEA 1.1®, Alvedia®	16
5. <i>Cross-match</i>	17
5.1. <i>Major cross-match</i>	18
5.2. <i>Minor cross-match</i>	18
6. Teste de Coombs.....	19
7. Citometria de fluxo	20
7.1. Princípios da citometria de fluxo	21
7.1.1. Imunofenotipagem.....	23
8. Reações transfusionais.....	24
8.1 Reações mediadas por mecanismos imunológicos agudas	24
8.1.1. Reação hemolítica.....	24
8.1.2. Reações alérgicas.....	25
8.1.3. Reações febris não hemolíticas	26
8.1.4. Lesão pulmonar aguda associada a transfusão	26
8.2. Reações imunomediadas tardias	27
8.2.1. Reação hemolítica.....	27
8.2.2. Púrpura pós-transfusional	27
8.2.3. Isoeritrolise Neonatal (IS).....	27
8.3. Reações agudas não mediadas por mecanismos imunológicos	28
8.3.1. Hipervolemia	28
8.3.2. Sepsis.....	29
8.3.3. Hemólise	29
8.3.4. Embolismo gasoso	29
8.3.5. Intoxicação por citrato.....	29
8.3.6. Hiperamonemia.....	30
8.4. Reações retardadas não mediadas por mecanismos imunológicos	30
8.4.1. Transmissão de doenças infecciosas	30
PARTE II- Componente experimental.....	31
1. Objetivos.....	31
2. Material e métodos	32
2.1. População estudada.....	32
2.1.1. Critérios de exclusão	32
2.2. Análises sanguíneas	32
2.2.1. Análises realizadas no VetAgro Sup	32
2.2.2. Análises realizadas por Dianov®.....	33

2.3. Classificação da intensidade da expressão antigénica pela tira da Alvedia®	33
2.4. Procedimentos em dadores	34
2.4.1. Antes da doação de sangue	34
2.4.2. Doação de sangue	34
2.4.3. Preparação dos produtos sanguíneos	36
2.5. Procedimentos em recetores	36
2.5.1. Antes da transfusão	36
2.5.2. Transfusão.....	36
2.5.3. Monitorização do paciente pós-transfusão.....	37
2.5.4. Seguimento pós- transfusão D1+ 24h.....	37
2.5.5. Seguimento pós- transfusão D1+ 1/2 meses.....	38
2.5.6. Seguimento pós-transfusão D1+ 4/6 meses.....	38
3.Resultados	38
3.1. Caracterização do banco de sangue	40
3.2. Análise dos pacientes	46
4. Discussão dos resultados e conclusão	62
III. Bibliografia	67
IV- Anexos	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do processamento dos vários produtos sanguíneos, adaptado de: Abrams-Ogg, A. & Gibson, G. (2012).....	3
Figura 2. Resultado da tipificação sanguínea utilizando o Quick Test DEA 1.1®. Imagem cedida por Alvedia®.....	17
Figura 3. Imagem ilustrativa, simplificada, acerca dos procedimentos do Major e Minor cross-match em tubo.	19
Figura 4. Esquema ilustrativo do princípio do teste de Coombs direto (TAD), adaptado de: Day, M.J. (2012).	20
Figura 5. Imagem ilustrativa do funcionamento do núcleo central contido na câmara de fluxo. Adaptado de: Ribeiro, N.F.S. (2010).	21
Figura 6. Ilustração do funcionamento do citómetro de fluxo e o seu sistema ótico. Adaptado de: Ribeiro, N.F.S. (2010).....	22
Figura 7. Esquema acerca da imunofenotipagem utilizada em hematologia para deteção do tipo sanguíneo DEA 1.1.	23
Figura 8. Diagrama representativo de procedimentos realizados em dadores e pacientes.....	34
Figura 9. Material necessário à doação de sangue.	35
Figura 10. Material necessário à transfusão sanguínea	37
Figura 11. Imagem esquemática acerca dos diferentes níveis de expressão antigénica demonstrados no tipo sanguíneo DEA 1 positivo pela tira imunocromatográfica da Alvedia®. Imagem cedida por: Alvedia®.	38

Figura 12. Exemplo de um citograma de um dador do banco de sangue com tipo DEA 1 positivo forte. Imagem cedida por: Alvedia®.	39
Figura 13. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Angelle à admissão.	48
Figura 14. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Gamelle.	49
Figura 15. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Angelle no controlo dos 1-2 meses.	50
Figura 16. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Ashka.	51
Figura 17. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Dona, 24 a 48 horas após a primeira transfusão com o dador Ashka.	51
Figura 18. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Dona, 1 a 2 meses após a última transfusão.	51
Figura 19. Histogramas e respetiva estatística do dador Eddy.	52
Figura 20. Citograma da paciente Feria à admissão.	52
Figura 21. Citograma da paciente Feria 24 a 48 horas pós- transfusão.	53
Figura 22. Citograma da paciente Feria 1 a 2 meses pós- transfusão.	53
Figura 23. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Ulysse C. à admissão.	56
Figura 24. Histogramas e respetiva estatística do dador Virgule.	57
Figura 25. Histogramas e respetiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 24-48 horas.	57
Figura 26. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Eiko.	57
Figura 27. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 24-48 horas após a segunda transfusão.	58
Figura 28. Histogramas e respetiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 1- 2 meses.	58
Figura 29. Histogramas do paciente Voltaire à admissão.	59
Figura 30. Histogramas e respetiva estatística do dador Ecuelle.	59
Figura 31. Citograma, histograma e respetiva estatística do dador Cooper.	60
Figura 32. Histogramas do paciente Voltaire, 24 a 48 horas após a segunda transfusão.	60
Figura 33. Histogramas e respetiva estatística do paciente Voltaire no controlo de 1 a 2 meses.	60
Figura 34. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Yerrine à admissão.	61
Figura 35. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Dali.	61
Figura 36. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Yerrine 24 a 48 horas após a transfusão.	62
Figura 37. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Yerrine no controlo de 1-2 meses.	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Soluções anticoagulantes e soluções nutritivas disponíveis comercialmente e respetivas validades dos eritrócitos, adaptada de: Abrams-Ogg, A. & Schneider, A. (2010).	2
Tabela 2. Sumário dos antígenios eritrócitários caninos, adaptado de: Hale,A. (2012).	7
Tabela 3. Frequência da expressão de DEA 1.1 de acordo com a raça, em Portugal, adaptado de: Ferreira, R.R., Gopegui, R..R. & Matos, A.J. (2011)	8
Tabela 4. Grupos sanguíneos felinos: raças e prevalência geográfica, adaptado de: Day, M.J. (2012).	11
Tabela 5. Tabela representativa das diferentes classificações da intensidade da expressão antigénica pela citometria de fluxo.	39

Tabela 6. Tabela com informação de todos os dadores do tipo sanguíneo DEA 1 positivo, do banco de sangue do SIAMU.....	40
Tabela 7. Tabela com informação de todos os dadores do tipo sanguíneo DEA 1 negativo, do banco de sangue do SIAMU	41
Tabela 8. Classificação dos dadores DEA 1, do banco de sangue do SIAMU, por alunos, através da tira imunocromatográfica da Alvedia®.	44
Tabela 9. Tabela com informação dos animais que participaram no estudo e receberam transfusões sanguíneas no SIAMU.	47

ÍNDICE DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Fórmula utilizada para o cálculo do volume de sangue total a administrar, adaptado de: Gibson & Abrams-Ogg,2012.....	28
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do tipo sanguíneo DEA 1 positivo e DEA 1 negativo no banco de sangue do SIAMU.	42
Gráfico 2. Distribuição da expressão antigénica do tipo sanguíneo DEA 1 positivo dos dadores do banco de sangue do SIAMU pela tira imunocromatográfica.....	43
Gráfico 3. Diagrama de extremos e quartis da variável MFI dos dadores DEA 1 positivo do banco de sangue do SIAMU (n=31).	43
Gráfico 4. Comparação da classificação da expressão antigénica através da tira imunocromatográfica da Alvedia e a citometria de fluxo.	44
Gráfico 5. Comparação da classificação da expressão antigénica dos dadores do tipo DEA 1 positivo, através da tira imunocromatográfica, por 5 alunos.	45
Gráfico 6. Distribuição das causas de transfusão entre os recetores.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac-	Anticorpo
ACD-	Ácido-citrato-dextrose
AHIM-	Anemia hemolítica imunomediada
AINE-	Anti inflamatório não esteróide
ARDS-	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
CAMV-	Centro de atendimento médico-veterinário
CE-	Concentrado de eritrócitos
CID-	Coagulação intravascular disseminada
CMAH-	Enzima hidroxilase citidina monofosfato-N- ácido acetilneuramínico
CP-	Concentrado de plaquetas
CPD-	Citrato-fosfato-dextrose
CPDA-1-	Citrato-fosfato-dextrose-adenina-1

CP2D- Citrato-fosfato-2-dextrose
Crio- Crioprecipitado
CrioS- Criossobrenadante
DEA- Dog erythrocyte antigen
ECG- Eletrocardiograma
EDTA- *Ethylenediamine tetraacetic acid*
FeLV- Vírus da leucemia felina
FITC- Isotiocianato de fluoresceína
FIV- Vírus da imunodeficiência felina
FSC- *Foward scatter*
Ht- Hematócrito
IgE- Imunoglobulina E
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
IS- Isoeritrólise Neonatal
MAC- Complexo de ataque membranário
MFI- Mean fluorescence intensity
NeuAc- Ácido N-acetilneuramínico
NeuGc- Ácido N-glicolilneuramínico
PAC- Plasma armazenado congelado
PBS- *Phosphate buffered saline*
PMT- Fotomultiplicador
PFC- Plasma fresco congelado
PRP-Plasma rico em plaquetas
Rh- *Rhesus*
SIAMU- *Soins Intensifs Anesthésiologie et Médecine d’Urgence*
SSC- Side scatter
ST- Sangue total
STA- Sangue total armazenado
STF- Sangue total fresco
TAD-Teste de antiglobulina direta
TAI- Teste de antiglobulina indireta
TID- Trombocitopénia imuno-mediada

LISTA DE SÍMBOLOS

®- Marca registrada

™ - Trademark

<- Menor

≥ - Igual ou superior

=- Igual

h- hora

IM- Intramuscular

IV- Intravenoso

NaCl- Cloreto de Sódio

Kg- Quilograma

Min- Minuto

dL- Decilitro

g- Grama

mg- Miligrama

mL- Mililitro

µg- Micrograma

µL- Microlitro

°C- Graus Celsius

%- Percentagem

d- Dias

FR- Frequência

N- Número

r- Rotações

rpm- Rotações por minuto

X- Vezes

PARTE I- Revisão Bibliográfica

1.Introdução

Desde que se procedeu à primeira transfusão sanguínea num cão, na Universidade de Oxford, em 1666, a evolução da área da medicina transfusional foi enorme (Hughes,2011). Transfusões sanguíneas constituem uma das práticas clínicas mais frequentes na medicina de urgência (Tocci, 2010). Um dos aspetos mais visíveis da evolução da medicina transfusional foi a terapia com diferentes componentes (Callan, 2010, citado por Graça, 2012).

Indicações para a realização de transfusões incluem: anemias graves devido a hemorragias agudas, hemólise devido a fármacos ou toxinas, doenças imunomediadas, doenças não regenerativas graves e isoeritrólise neonatal (Tocci, 2010).

Os grupos sanguíneos caninos foram definidos na década de 50 e desde essa altura ocorreu um grande progresso com a descoberta de novos tipos sanguíneos. Devido à baixa prevalência de aloanticorpos que ocorrem naturalmente nos canídeos, a compatibilidade sanguínea aquando da transfusão sanguínea não tinha grande importância clínica até o paciente ser submetido a uma segunda transfusão (Hale, 2012).

Devido a uma maior frequência de pacientes com história de transfusões múltiplas, é indispensável proceder à tipificação sanguínea (do dador e paciente) e *cross-match* antes do início da transfusão, uma vez que transfusões acarretam riscos de reações severas (Tocci, 2010). Para este propósito foram desenvolvidos varios métodos de tipificação sanguínea. Dois deles, a tira imunocromatográfica da Alvedia® e o cartão RapidVet®-H podem ser utilizados nos centros de atendimento médico-veterinário (CAMV) uma vez que são simples, rápidos e de fácil interpretação porém não são 100% fiáveis. Ambos os métodos utilizam anticorpos monoclonais anti DEA 1.1 em que um resultado positivo consiste na presença do antigénio DEA 1.1. A tira imunocromatográfica possui os anticorpos numa membrana, os quais vão reagir com os eritrócitos DEA 1.1 positivos, resultando numa faixa vermelha na membrana. No método em cartão, o sangue é misturado com o reagente numa área de teste que contém os anticorpos monoclonais liofilizados. Neste teste a classificação é feita através da observação da área de teste. Outros métodos mais complexos necessitam de operadores especializados e material e/ou reagentes específicos.

A citometria de fluxo é também um método de tipificação sanguínea. É uma técnica emergente em medicina veterinária que permite identificar, quantificar e classificar partículas em meio líquido, em fluxo, podendo ter várias aplicações em em diferentes áreas (Nakage, Santana, Cápua & Coelho,2005). Apesar do custo elevado e a necessidade de operadores especializados, este método tem uma ampla aplicação em hematologia veterinária, permitindo ultrapassar as

limitações de outros métodos os quais podem conduzir a incompatibilidades nas transfusões sanguíneas e consequentemente reações adversas severas, inclusive a morte do paciente.

2. Produtos sanguíneos

O sangue é constituído por diferentes elementos e atualmente, devido ao aparecimento de bancos de sangue em medicina veterinária, é possível proceder-se à transfusão seletiva de cada um deles, uma vez que estes têm diferentes indicações. A separação dos diferentes constituintes além de permitir um maior aproveitamento de recursos permite que o paciente receba um tratamento mais específico e adequado. Os produtos sanguíneos utilizados são armazenados em sacos de colheita, de diferentes tamanhos e que contêm anticoagulantes, descritos na tabela 1, para prevenir a formação de coágulos durante e após a colheita. O citrato de sódio é o anticoagulante mais utilizado uma vez que é um quelante do cálcio, inibindo os vários passos da cascata de coagulação dependentes daquele (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). Os sacos de colheita têm muitas vezes, sacos satélite que possuem soluções nutritivas que preservam e aumentam a validade dos produtos (Hughes, 2011).

Tabela 1. Soluções anticoagulantes e soluções nutritivas disponíveis comercialmente e respetivas validades dos eritrócitos, adaptada de: Abrams-Ogg, A. & Schneider, A. (2010).

Sacos com solução anticoagulante	Sacos com solução nutritiva	Validade dos eritrócitos armazenados a 1°C-6°C (dias)
Solução Ácido-citrato-dextrose (ACD)	Nenhum	Não descrito
Solução Citrato-fosfato-dextrose-adenina-1 (CPDA-1)	Nenhum	20 d
Solução Citrato-fosfato-dextrose (CPD)	AS-1 (Adsol, Fenwal, Deerfield, IL)	37 d
	AS-5 (Optisol, Terumo, Somerset, NJ)	35 d
Solução Citrato-fosfato-2-dextrose (CP2D)	AS-3 (Nutricel, Medsep, Cavena, CA)	35 d

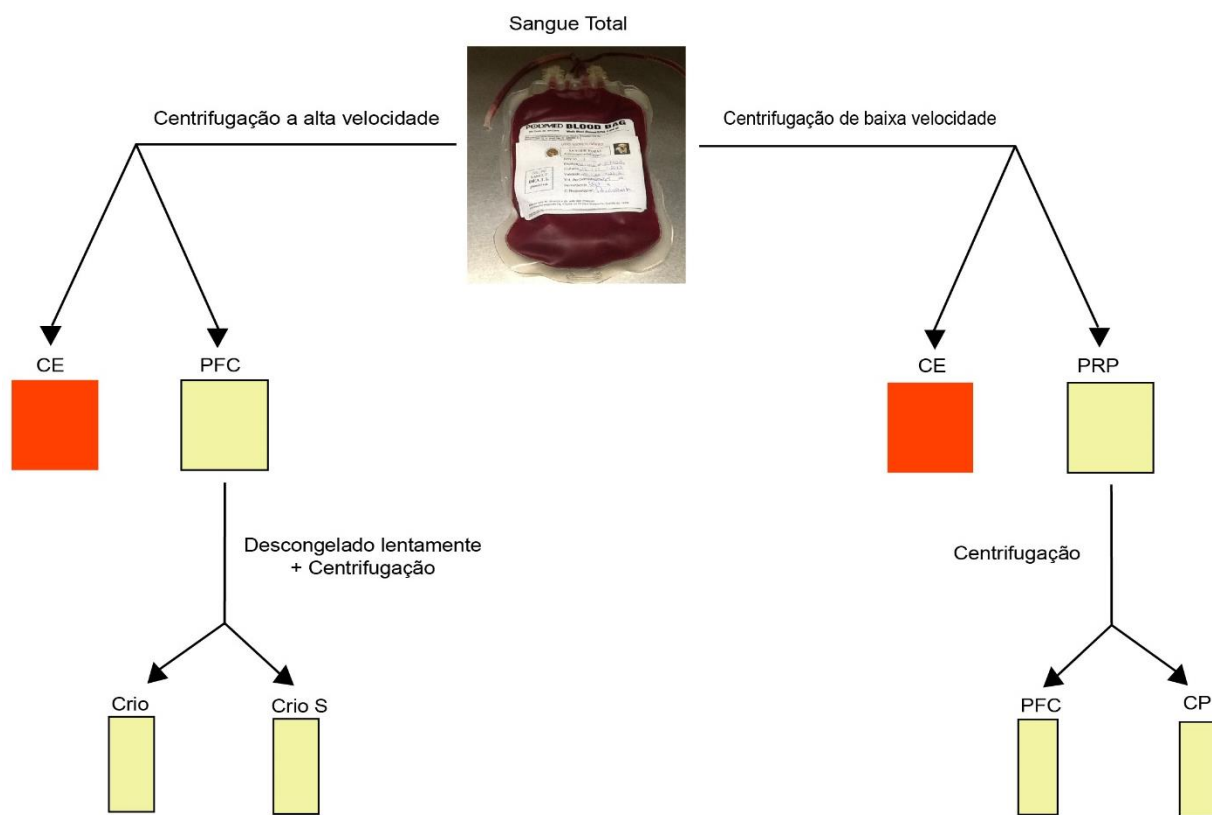
2.1. Sangue total (ST)

Conforme descrito na figura 1, é a partir do sangue total que se obtém os vários componentes sanguíneos.

2.1.1. Sangue total fresco (STF)

Considera-se STF se aquele for utilizado até oito horas após a colheita. Este produto não é refrigerado e contém todos os componentes sanguíneos: eritrócitos, plaquetas, fatores de coagulação lábeis e estáveis e proteínas plasmáticas (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). Este é o produto usado mais frequentemente em CAMV uma vez que não requer de equipamento e operadores especializados para a sua separação. É indicado em anemias combinadas com uma alteração da hemóstase, anemias associadas a trombocitopenia ou em trombopatia que origine uma hemorragia incontrolável (Callan, 2010).

Figura 1. Ilustração do processamento dos vários produtos sanguíneos, adaptado de: Abrams-Ogg, A. & Gibson, G. (2012).



Legenda: CE- concentrado de eritrócitos; PFC- plasma fresco congelado; PRP- plasma rico em plaquetas; Crio- Crioprecipitado; Crio S- Criosobrenadante; CP- concentrado de plaquetas.

2.1.2. Sangue total armazenado (STA)

É designado STA o STF que não é utilizado nas oito horas após a colheita. Este deve ser refrigerado a uma temperatura de 1°C a 6°C durante aproximadamente 21-28 dias, dependendo do anticoagulante/solução nutritiva utilizado. Este produto difere do STF na medida em que há uma redução dos fatores de coagulação lábeis e de plaquetas (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). O STA é indicado nos casos de anemia com hipoproteinémia, como, por exemplo nos casos de hemorragia gastrointestinal crónica (Callan, 2010).

2.2. Concentrado de eritrócitos (CE)

O CE é separado do plasma através de centrifugação. O saco de colheita deve ter sacos satélite para se transferir o plasma em sistema fechado. Uma unidade CE tem, aproximadamente, um hematócrito de 70-80% e uma validade de 35 dias a uma temperatura de 1°C a 6°C, quando adicionada uma solução nutritiva (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). A transfusão de CE está indicada em casos de anemia severa em animais normovolémicos (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). É também útil em animais anémicos com doença cardíaca subjacente, uma vez que previne desenvolvimento de hipervolemia (Callan, 2010).

2.3. Produtos do plasma

2.3.1. Plasma fresco congelado (PFC)

O PFC consiste no plasma que é separado dos eritrócitos, por centrifugação, no máximo, até oito horas após a colheita e congelado, rapidamente, até uma hora depois da separação (Brooks, 2010). Este produto contém quantidades máximas dos fatores de coagulação lábeis V, VIII e factor de *von Willebrand* assim como todos os outros factores de coagulação e proteínas plasmáticas. O PFC deve ser mantido a uma temperatura igual ou inferior a -20°C e tem validade de um ano. Este produto é indicado em casos de coagulopatias adquiridas ou congénitas. Uma vez que contém proteínas plasmáticas, pode ser utilizado em animais com hipoproteinémia (Gibson & Abrams-Ogg, 2012).

2.3.2. Plasma armazenado congelado (PAC)

É considerado PAC quando o plasma fresco tem um tempo de armazenamento superior a um ano, quando o plasma não é congelado rapidamente, não protegendo os fatores lábeis ou quando a unidade é descongelada e posteriormente congelada sem o saco de colheita ser aberto (Gibson

& Abrams- Ogg, 2012). Também se considera PAC quando o plasma é congelado oito horas após a colheita. No PAC perdeu-se a atividade de proteínas plasmáticas importantes, incluindo os fatores de coagulação lábeis, no entanto este componente contém albumina, podendo ser utilizado como fluido colóide (Hughes,2011). O PAC é indicado no tratamento da deficiência de vitamina K e envenenamento por antagonistas da vitamina K, uma vez que, este produto contém fatores dependentes da vitamina K (Gibson & Abrams- Ogg, 2012).

2.3.3. Plasma rico em plaquetas (PRP)

É um produto preparado através do STF, porém é necessário muito cuidado na preparação e manuseamento deste componente. É preparado através da centrifugação a baixa velocidade do STF com o objetivo de se obter uma unidade com pelo menos 5×10^{10} plaquetas. Deve ser armazenado a uma temperatura de 20°C a 24°C durante no máximo cinco dias (Gibson & Abrams-Ogg,2012). O PRP deve ser constantemente agitado (Hughes,2011) e é utilizado quando existem hemorragias graves, causadas por trombocitopenia ou trombocitopatias. Não é contudo, muito eficaz uma vez que são necessários seis doadores de sangue para obter plaquetas suficientes para o tratamento de um animal com trombocitopénia (Hughes,2011).

2.3.4 Crioprecipitado (Crio)

Este componente é preparado através do PFC, no máximo até um ano após a colheita. PFC é descongelado, lentamente, a 4°C, temperatura em que ainda 10% do plasma continua congelado (Gibson & Abrams-Ogg,2012). Depois da descongelação, o plasma é centrifugado à mesma temperatura. O fator de *von Willebrand*, o fibrinogénio, fator VIII, e fibronectina precipitam a esta temperatura e são mantidos numa quantidade muito pequena de plasma, aproximadamente 1/10 do volume inicial de PFC. O Crio deve ser utilizado até um ano após a colheita inicial e mantido a uma temperatura igual ou inferior a -18°C (Hughes,2011). Este produto é indicado para pacientes com hemorragias devido a uma deficiência ou disfunção do fator VIII (hemofilia A), fator de *von Willebrand* ou fibrinogénio (Gibson & Abrams-Ogg,2012).

2.3.5. Criosobrenadante (CrioS)

É o componente que resta após a produção de Crio. O CrioS não contém fator de *von willebrand*, fator VIII, fibrinogénio e fibronectina mas possui proteínas como albumina, a maioria das proteínas hemostáticas e imunoglobulinas (Brooks, 2010). Tal como o Crio, deve ser utilizado até um ano após a colheita inicial a uma temperatura igual ou inferior a -18°C. Este produto está indicado

para coagulopatias que não requeiram suplementação dos componentes presentes no Crioprecipitado ou em pacientes com hipoproteinemia (Gibson & Abrams-Ogg,2012).

2.4 Concentrado de plaquetas (CP)

É preparado através do PRP. Após centrifugação do PRP, todo o conteúdo, com exceção de 35 ml a 70 ml do sobrenadante, são transferidos para um saco satélite e congelados como PFC. O sobrenadante é então designado de CP e é armazenado a uma temperatura de 20°C a 24°C com agitação contínua durante cinco dias, em sistema fechado. Uma vez que a temperatura de armazenamento é superior do que nos restantes produtos, este componente está mais suscetível a uma contaminação bacteriana. Assim, uma vez colhido em sistema aberto deve ser utilizado, no máximo, 4 horas após colheita (Gibson & Abrams-Ogg,2012).

3. Grupos sanguíneos

Os grupos sanguíneos são definidos por antígenos (glicolípidos e glicoproteínas) presentes na membrana celular dos eritrócitos. Estes marcadores genéticos são específicos da espécie e variam na imunogenicidade e significância clínica. Um conjunto de dois a vários alelos num *locus* constitui o sistema sanguíneo (Giger, Knut & Palos, 2005). Os antígenos dos eritrócitos contribuem para o reconhecimento como *self* e podem estimular a produção de anticorpos(Ac), quando introduzidos na circulação de um animal cujos eritrócitos não possuam esse antígeno. (Tocci & Ewing, 2009). Estes anticorpos podem ser imunoglobulinas G (IgG) e imunoglobulinas M (IgM) (Davidow, 2012a).

3.1. Canídeos

Em 1910, foi reconhecida a existência de antígenos eritrocitários diferentes em canídeos. No entanto, só em 1940 foram descritos grupos sanguíneos (Davidow,2012a). Até à data já foram descritos mais de 20 grupos sanguíneos. Porém não foram ainda realizados estudos rigorosos para determinar se todos os grupos são serologicamente distintos.

A convenção atual utiliza o acrónimo DEA que significa *Dog erythrocyte antigen*, seguido da designação numérica do grupo sanguíneo (Hohenhaus, 2004). Existem os grupos DEA 1.1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Atualmente já não existe soro de tipificação para DEA 6 e DEA 8 logo estes antígenos não podem ser analisados. Pouco se sabe acerca das potenciais funções que estes antígenos têm ou a sua composição bioquímica, mas a sua potencial antigenicidade está descrita (Weinstein & Sink, 2012).

Tabela 2. Sumário dos antígenos eritrócitários caninos, adaptado de: Hale,A. (2012).

DEA	Fenótipo dos antígenos	Incidência de aloanticorpos	Comentários
1	1.1, nulo	<2%	
3	3, nulo	8-15%	Não há soro tipificador
4	4, nulo	Rara	
5	5, nulo	8-12%	Não há soro tipificador
6	6, nulo	Desconhecida	Não há soro tipificador
7	7, 7', nulo	10-40%	
8	8, nulo	Desconhecida	Não há soro tipificador
Dal	Dal, nulo	Rara	Não há sistema de tipificação comercial

3.1.1. DEA 1

O antígeno DEA 1.1 é considerado o mais importante clinicamente, uma vez que, é o mais antigénico antígeno eritrócitário. De uma maneira geral, a quantidade de canídeos DEA positivos e DEA negativos é semelhante, todavia a sua frequência varia geograficamente e consoante raças (Seth, Jackson, Winzelberg & Giger, 2012). Um estudo recente, com os respetivos resultados descritos na tabela 3, determinou a prevalência do antígeno DEA 1.1 em Portugal, em que, em 274 canídeos 43,1% eram DEA 1.1 negativos e 56,9% eram DEA 1.1 positivos (Ferreira, Gopegui & Matos, 2011). Como já foi dito anteriormente, ao contrário dos gatos, nos cães existe uma baixa prevalência de aloanticorpos que ocorram naturalmente. Porém estes podem ser induzidos através de uma transfusão entre tipos incompatíveis. Sendo o DEA 1.1 o grupo sanguíneo mais antigénico, é aconselhável que potenciais dadores ou recetores tenham o seu sangue tipificado para verificar se são DEA 1.1 positivos ou negativos ou então deve efetuar-se um *cross-match*, de maneira a prevenir uma reação hemolítica aguda. Em suma, um paciente DEA 1.1 negativo exposto a um dador 1.1 positivo tem uma maior probabilidade de ficar com os eritrócitos sensibilizados e produzir anticorpos anti DEA 1.1, estando em risco para desenvolvimento de reações posteriores (Tocci & Ewing, 2009).

Ao contrário do que se pensava, os tipos sanguíneos DEA 1.2 e DEA 1.3 não são tipos sanguíneos, mas sim uma expressão diferente do mesmo antígeno eritrócitário, neste caso o DEA 1.1. O primeiro indício que os antígenos DEA 1.2 e DEA 1.3 eram uma variante do DEA 1.1 quando se verificou que anticorpos anti DEA 1.2 não podiam ser produzidos usando células DEA

1.2 devido à sua baixa antigenicidade, mas sim células DEA 1.1. Com o advento dos vários *kits* policlonais, os resultados indicam que apenas era encontrado DEA 1.1 e foi demonstrado que esses testes identificavam corretamente todas as variáveis de DEA 1. Quando as mesmas amostras sanguíneas eram enviadas para laboratórios independentes, foi confirmado que era possível determinar amostras DEA 1.2 através da interpretação do grau de aglutinação apresentado no cartão ou nas tiras (Animal Blood Resources International, 2012).

Tabela 3. Frequência da expressão de DEA 1.1 de acordo com a raça, em Portugal, adaptado de: Ferreira, R.R., Gopegui, R..R. & Matos, A.J. (2011)

Raça	N	%	DEA 1.1 +		DEA 1.1 -	
			N	%	N	%
Cruzamento de raças	57	20,8	35	61.4	22	38.6
Dogue Alemão	5	1.8	5	100	0	0
São Bernardo	14	5.1	14	100	0	0
Golden Retriever	9	3.3	8	88.9	1	11.1
Rottweiler	17	6.2	15	88.2	2	11.8
Weimaraner	5	1.9	4	80	1	20
Caniche	7	2.6	4	57.1	3	42.9
Husky Siberiano	7	2.6	4	57.1	3	42.9
Labrador Retriever	29	10.6	13	44.8	16	55.2
Cocker Spaniel	16	5.8	5	31.3	11	68.8
Boxer	13	4.7	0	0	13	100
Doberman	12	4.4	0	0	12	100
Pastor Alemão	10	3.6	0	0	10	100
Outros (raças)	73	26.6	49	67.1	24	32.9

representadas por menos de 5 animais)						
Total	274	100	156	56.9	118	43.1

3.1.2. DEA 3

O DEA 3 possui dois fenótipos, o DEA 3 positivo, que corresponde à presença do antígeno e o fenótipo nulo que corresponde à ausência do antígeno. O A presença de antígeno DEA 3 é rara na população geral, sendo mais comum em raças americanas, como os *Greyhounds* e raças japonesas. Este tipo sanguíneo só pode ser classificado através de anti soro DEA 3, uma vez que não existem métodos de tipificação rápida para este grupo.

Foram identificados aloanticorpos naturais em 20% dos cães americanos. Estes anticorpos não causam reações agudas, mas sim reações retardadas que consistem na remoção abrupta das células em circulação entre 5 a 7 dias após a transfusão (Hale, 2012). Atualmente não é possível tipificar este antígeno sanguíneo uma vez que não está disponível soro tipificador (Animal Blood Resources International, 2014).

3.1.3. DEA 4

O DEA 4 possui dois fenótipos, o DEA 4 positivo, que correspondente à presença do antígeno, sobre o fenótipo nulo que corresponde à ausência de antígeno. O DEA 4 positivo é dominante sobre o fenótipo nulo. O tipo DEA 4 é intitulado por muitos como um dador universal, uma vez que, ainda não foi documentada a existência de aloanticorpos naturais contra este antígeno e existem dadores com grande incidência deste antígeno (98%). No entanto já foi descrita uma reação pós-transfusional num canídeo DEA 4 negativo previamente sensibilizado com eritrócitos DEA 4 positivos (Tocci, 2010).

Tal como no DEA 3, não existem métodos de tipificação rápida para este tipo, sanguíneo, sendo a tipificação realizada em laboratórios especializados que possuam soro anti DEA 4 (Hale, 2012).

3.1.4. DEA 5

À semelhança do DEA 3 e DEA 4, o DEA 5 possui um fenótipo dominante, correspondente à presença do antígeno e um fenótipo em que o antígeno está ausente, DEA 5 negativo. Este antígeno é raro com exceção em *Greyhounds* americanos e raças Japonesas, com a sua prevalência na população geral a ser de 10-15%. Tal como no tipo DEA 3 atualmente não é

possível tipificar este antígeno sanguíneo uma vez que não está disponível soro tipificador (Animal Blood Resources International, 2014).

A incidência de aloanticorpos naturais DEA 5 é de 10% e a incompatibilidade com este antígeno causa uma reação retardada com remoção dos eritrócitos em circulação (Hale, 2012).

3.1.5. DEA 7

Este tipo sanguíneo consiste em dois antígenos, o DEA 7 e DEA 7' e à semelhança dos outros tipos sanguíneos possuiu o fenótipo nulo, o DEA 7 negativo. O antígeno em questão não é um antígeno integral de membrana, podendo ser encontrado em circulação, no plasma e mesmo na saliva. A ligação passiva do antígeno ao eritrócito faz com que os métodos clássicos de tipificação sejam mais difíceis (Hale, 2012).

Aloanticorpos para DEA 7 estão presentes em 20-40% da população canina, porém estes anticorpos existem em títulos baixos, dando origem a um tempo de sobrevivência eritrocitária reduzido e a reações retardadas (Kessler *et al.*, 2010).

3.1.6. Novo antígeno Dal

A suspeita de um novo antígeno surgiu quando uma cadela Dálmata, designada de cadela *index*, recetora de transfusões prévias revelou ser incompatível, através de testes de *cross-match*, com todos os 55 dadores (31 DEA 1.1 positivos e 24 DEA 1.1 negativos), incluindo aqueles que já haviam sido utilizados, o que sugere que houve formação de anticorpos contra um antígeno eritrocitário ausente na cadela Dálmata, comum entre os dadores. Após estes resultados foram testados 25 Dálmatas sem qualquer grau de parentesco com a cadela *index* e 4 deles revelaram ser compatíveis, isto é, também não possuem o mesmo antígeno. A paciente e alguns dadores incompatíveis foram tipificados e concluiu-se que todos os tipos sanguíneos do sistema DEA, pelos menos para os que possuem soro tipificador, podiam ser excluídos como motivo da incompatibilidade. Os anticorpos anti-Dal podem causar reações hemolíticas agudas ou retardadas com destruição dos eritrócitos transfundidos (Blais, Berman, Oakley & Giger, 2007).

3.2. Felinos

O sistema de tipificação felino AB é o mais reconhecido e inclui três tipos sanguíneos A, B e AB (Ferreira, Lobo, Guimarães, Matos, 2008). Embora com um nome semelhante não tem qualquer relação com o sistema de tipificação humano ABO (Weinstein & Sink, 2012). Os alelos *a* e *b* pertencem ao mesmo *locus* genético, sendo *a* dominante sobre *b* (Ferreira, Lobo, Guimarães &

Matos, 2008). O fenótipo AB é resultado de um terceiro alelo a^{ab} que permite uma expressão co-dominante dos alelos a e b . O alelo a^{ab} é recessivo em relação ao alelo a , mas dominante sobre o alelo b . Existem novos progressos nesta área, como o reconhecimento do novo antígeno sanguíneo Mik, a caracterização molecular da regulação da expressão dos antígenos A e B e o aparecimento de técnicas de tipificação simples. A prevalência dos tipos sanguíneos, tal como nos cães, varia geograficamente e consoante a raça (Day, 2012) conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Grupos sanguíneos felinos: raças e prevalência geográfica, adaptado de: Day, M.J. (2012).

Raça	Tipo A (%)	Tipo B (%)	Tipo AB (%)	N	País	Referência
Abissínio	100	0	0	36	Austrália	Barrs et al.,2009
	89	11	0	30	Austrália	Malik et al., 2005
	100	0	0		Hungria	Bagdi et al.,2001
Bengal	100	0	0	100	Reino Unido	Gunn-Moore et al.,2009
	86	14	0	7	Reino Unido	Forcada et al.,2007
Birmanês	100	0	0	5	Reino Unido	Forcada et al.,2007
	93	3	3	30	Austrália	Malik et al.,2005
Chartreux	77.8	18.5	3.7	27	Alemanha	Weingart et al.,2006
Persa	80	20	0	5	Reino Unido	Forcada et al.,2007
	67	22	11	9	Austrália	Malik et al.,2005
	100	0	0	7	Portugal	Silvestre-Ferreira et al.,2004

	66.6	33.3	0		Hungria	Badgi et al.,2001
Ragdoll	80	20	0	5	Austrália	Malik et al.,2005
Azul Russo	80	20	0	5	Austrália	Malik et al.,2005
Siamês	100	0	0	13	Reino Unido	Forcada et al.,2007
	100	0	0	12	Austrália	Malik et al.,2005
	100	0	0	19	Portugal	Silvestre-Ferreira et al.,2004
	100	0	0		Hungria	Badgi et al.,2001
Somali	100	0	0	24	Austrália	Barrs et al.,2009
	71.4	23.8	4.8	21	Alemanha	Weingart et al.,2006
Angorá turco	53.6	46.4	0	28	Turquia	Arikan et al.,2003
Turkish Van	42.3	57.7	0	78	Turquia	Arikan and Akkan et al.,2004
	40	60	0	85	Turquia	Arikan et al.,2003

3.2.1. Sistema AB

O antígeno A é o Ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc) e o antígeno B Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc). Gatos tipo A têm maior quantidade de NeuGc e pouca quantidade de NeuAc, enquanto que gatos tipo B apenas têm NeuAc.(Day, 2012). Segundo Davidow (2012), trabalhos recentes na área da genética determinaram que mutações na enzima hidroxilase citidina monofosfato-N-ácido acetilneuramínico (CMAH) são responsáveis pelo tipo sanguíneo B uma vez que,a CMAH converte NeuAc em NeuGc, logo, a ausência desta enzima leva a uma acumulação de NeuA.

De uma maneira geral, o tipo sanguíneo A tem uma maior prevalência na população em geral. Porém o tipo B tem uma prevalência maior em determinadas raças puras, tais como *British Shorthair*, *Birman*, *Devon* e *Cornish Rex*, *Abyssinian*, *Persian*, *Somali*, *Turkish Angora* e *Turkish Van* (Day, 2012).

Ao contrário dos cães, os gatos, aproximadamente, desde o primeiro mês de idade produzem aloanticorpos contra antígenos que os mesmos não possuem, sem ser necessária uma anterior sensibilização através de uma transfusão sanguínea. A estes anticorpos dá-se o nome de aloanticorpos que ocorrem naturalmente. É então muito importante a tipificação, uma vez que, 1 ml de sangue tipo A administrado a um gato tipo B pode resultar na morte do recetor (Weinstein & Sink, 2012). Gatos tipo A produzem aloanticorpos anti-B, que estão presentes em variadas concentrações, dependendo do gato. Gatos tipo B têm normalmente elevados títulos de aloanticorpos anti-A em circulação (Day, 2012). Gatos tipo AB não produzem aloanticorpos anti-A, nem anti-B uma vez que reconhecem ambos como *self* (Weinstein & Sink, 2012).

3.2.2. Novo antígeno Mik

Recentemente foi descrito um novo antígeno eritrocitário felino, por Weinstein *et al* (2007). A este novo antígeno deu-se o nome de Mik. Este antígeno começou a ser analisado, quando se observou *cross-matches* incompatíveis em amostras consideradas compatíveis através dos testes de tipificação. Este facto sugeria a existência de outros grupos sanguíneos desconhecidos (independentes do sistema AB) ou reacções contra proteínas plasmáticas, leucócitos ou plaquetas (Weingart *et al.*, 2004 citado por Graça, 2012).

Foram testados dadores para a presença de auto-anticorpos e aloanticorpos através do teste de Coombs (explicado mais à frente) e *cross-match* (explicado noutra tópico) foi realizada a tipificação sanguínea pelo sistema AB através das técnicas em tubo (explicadas posteriormente). Testaram-se 65 gatos e um gato que recebeu transplante renal. O *cross-match* de 3 dos 65 gatos e do paciente transplantado revelou existirem incompatibilidades. Este facto indica que estes gatos possuem aloanticorpos contra um antígeno que neles está ausente (Weinstein *et al.*, 2007). Estes 4 animais possuíam um resultado de *cross-match* compatível entre eles.

4. Tipificação sanguínea

4.1. Hemaglutinação e autoaglutinação

O termo geral utilizado para descrever aglomeração visível de eritrócitos é aglutinação ou hemaglutinação. Há aglutinação quando anticorpos presentes no plasma aderem aos antígenos

existentes na membrana celular dos eritrócitos, ligando-os uns aos outros, formando agregações que podem ser vistas *in vitro*. A hemaglutinação ocorre porque o plasma do recetor contém anticorpos contra os eritrócitos do dador.

A autoaglutinação, isto é, anticorpos contra os próprios eritrócitos, pode ocorrer no caso de uma anemia hemolítica imunomediada com destruição de eritrócitos.

A hemaglutinação é a base da tipificação sanguínea e dos testes de *cross-match*, correspondendo a um resultado positivo, ou seja, reativo. A existência de autoaglutinação pode dar origem a um falso positivo quando se testam sangues de diferentes origens, sendo necessário proceder-se à lavagem dos eritrócitos antes de se repetir o teste para verificar se existe uma verdadeira incompatibilidade (Weinstein & Sink, 2012).

4.2. Tipificação em laboratórios de referência

A *The International Society of Animal Genetics* é responsável pela standardização dos reagentes da tipificação sanguínea e a disponibilidade dos mesmos para tipificação extensiva é limitada (Tocci, 2010). Este método, considerado o *gold standard*, consiste na aglutinação em tubo e é o único método existente para testar DEA 4 e 7 em que se adiciona uma suspensão de eritrócitos ao respetivo soro policlonal, o único disponível para estes antígenos e após centrifugação é observada, ou não, macroscopicamente, uma reação de aglutinação, classificando assim o tipo sanguíneo da amostra. Este método é o mais fidedigno em relação a outros na medida em que indica o tipo sanguíneo (Kessler et al., 2010).

A probabilidade de estes tipos sanguíneos ocorrerem é aproximadamente 5%. Para além disso, se estiverem presentes e ocorrer incompatibilidade é mais provável que ocorra uma reação retardada ao contrário das reações agudas que ocorrem com o tipo DEA 1.1. Por segurança, para prevenir qualquer tipo de reação, deve proceder-se sempre a um *cross-match* antes de se dar início à transfusão (Animal Blood Resources International, 2014).

4.3. ID-Gel Test Canine 1.1®, Dia-Med-Vet

Método utilizado desde 2003 (Seth et al., 2012), que utiliza anticorpos monoclonais. Neste os eritrócitos são obrigados a passar pelos microtubos, em forma de colunas e cheios com gel. As partículas de gel atuam como uma peneira, que contém o anticorpo anti DEA 1.1. Os tubos são posteriormente colocados numa centrífuga para favorecer a migração dos eritrócitos pelos tubos. Também está disponível soro policlonal anti DEA 4 e 7, não sendo muito utilizado comparativamente com o método em tubo (Kessler et al., 2010). O princípio deste teste é uma hemaglutinação visível, onde as células não aglutinadas passam pelo gel e acumulam-se no

fundo do microtubo enquanto que, as aglutinadas ficam suspensas no gel (Tocci & Ewing, 2009). Este teste também contém um tubo de controlo que possui apenas gel. Uma amostra DEA 1.1 positiva irá formar uma linha de aglutinação na superfície do gel e eritrócitos DEA 1.1 negativos irão formar um aglomerado no fundo do tubo (Kessler et al., 2010).

Este método tem vantagens sobre os métodos referidos anteriormente, na medida em que, é mais fácil de interpretar visualmente e, adicionalmente, o gel fixa a reação de aglutinação para poder ser examinado posteriormente, permitindo uma confirmação dos resultados. Como desvantagens, o teste apresenta o fato de a centrifugação só poder ser feita numa centrífuga específica e além disso é um processo que envolve vários procedimentos complexos, o que limita o seu uso, estando disponível apenas, na maioria das vezes, em laboratórios especializados (Tocci & Ewing, 2009). Atualmente o teste em coluna de gel não está disponível comercialmente (Blois, Richardson & Abrams-Ogg, 2013).

Segundo Blois, Richardson & Abrams-Ogg (2013) o método de coluna de gel tem uma excelente concordância com a tipificação em tubo com anticorpos policlonais, feita por um laboratório de referência. Num estudo comparando o QuickTest DEA1.1® com o teste em coluna de gel analisando as amostras de animais saudáveis e doentes, em 85 amostras, 84 apresentavam resultados iguais, isto é, 98,8% eram concordantes. Os resultados da coluna de gel foram classificados numa escala de 0 a +4, dependendo no grau de aglutinação. Os resultados considerados inconclusivos apresentavam uma reação de +1, os resultados eram considerados DEA 1.1 se a reação fosse ≥ 2 . A amostra com resultados discordantes pertencia a um cão que tinha anemia hemolítica e trombocitopenia imunomediadas no qual o resultado com a coluna de gel foi DEA 1.1 negativo e com a tira DEA 1.1 positivo.

Segundo Seth et al. (2012), os métodos de cartão e tira são suficientemente precisos, porém inferiores ao método de coluna de gel.

4.4. Testes rápidos realizados nos CAMV

4.4.1. RapidVet®-H (Canine DEA 1.1) Agglutination Test Cards, DMS Laboratories, Inc.

Este tipo de teste está disponível desde a década de 90. O cartão contém anticorpos monoclonais anti DEA 1.1 murínicos liofilizados, que são reconstituídos após a adição do diluente presente no *kit*, formando o anti soro DEA 1.1. O sangue total é depois bem misturado com o anti soro. Eritrócitos DEA 1.1 positivos irão reagir com o anti soro, resultando em aglutinação, enquanto que eritrócitos DEA 1.1 negativos não irão reagir (Tocci & Ewing, 2009).

O cartão possui uma área de teste apenas com solução salina para detetar casos de autoaglutinação. É necessário a lavagem dos eritrócitos e repetição do teste em caso de

autoaglutinação. Segundo Tocci & Ewing (2009) foram reportados falsos positivos com os cartões de tipificação.

Este método de tipificação é rápido (resultados em menos de dois minutos) e possui resultados confiáveis, porém, tendo em conta a subjetividade da classificação da hemaglutinação é um teste que deve ser analisado por um operador especializado (Weinstein & Sink, 2012). Em animais gravemente anémicos, isto é, com hematócrito (Ht) igual ou inferior a 15%, o resultado pode ser falso negativo, ou seja, presença de uma hemaglutinação fraca ou ausente. Em caso de anemia a amostra pode ser concentrada, isto é, centrifugando e removendo plasma, de maneira a aproximar-se ao hematócrito considerado normal para o resultado ser fidedigno.

4.4.2. Quick Test DEA 1.1®, Alvedia®

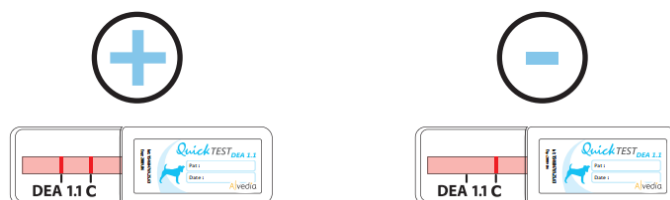
É uma técnica imunocromatográfica que utiliza uma membrana contendo anticorpos monoclonais para o antígeno DEA 1.1. A ação capilar, sob a influência de um tampão, resulta na migração dos eritrócitos na membrana. Eritrócitos DEA 1.1 positivos vão reagir com os anticorpos monoclonais ficando aprisionados, resultando numa faixa vermelha na membrana, como se pode ver na figura 2. Os eritrócitos DEA 1.1 negativos não irão reagir com os anticorpos, não existindo faixa vermelha neste caso. É um teste fidedigno em caso de autoaglutinação uma vez que células aglutinadas ficam retidas no início da tira de maneira que, apenas células não aglutinadas participam no teste (Alvedia®, 2012a). A tira ainda possui uma zona contendo proteínas designadas de lectinas de controlo, uma vez que se ligam a qualquer eritrócito, graças à sua capacidade de se ligar, reversivelmente, a carboidratos. Esta banda de controlo faz com que o teste seja válido (Seth *et al.*, 2012).

Em caso de anemia é possível obter um resultado fidedigno, não sendo necessário recorrer, na maioria dos casos, à concentração da amostra. Num estudo realizado por Seth *et al.* (2012), notou-se que, em três amostras, com hematócritos de 10%, 30% e 50% a linha era visível. Porém à medida que o Ht diminuía mais difícil foi classificar a amostra, devido à difícil visualização da linha. Tal pode dar origem a um resultado falso negativo se analisada por um operador pouco experiente.

Segundo Davidow (2012a), num estudo recente, comparou-se os métodos de cartão, a tira imunocromatográfica e o teste em coluna de gel em cães saudáveis e doentes. Houve concordância em 69 das 88 amostras (78%). Em 6 casos o resultado com o Quick Test® foi DEA 1.1 negativo, enquanto que, com o cartão RapidVet® e o teste de coluna de gel foi DEA 1.1 positivo. Em 18 casos o resultado com cartão RapidVet® foi diferente do Quick Test® e do teste de coluna de gel, revelando ser DEA 1.1 positivo em 15 e DEA 1.1 negativo em 3. Devido à

disparidade de resultados nestes sistemas, é recomendado que, o tipo sanguíneo para doadores seja confirmado por um laboratório especializado.

Figura 2. Resultado da tipificação sanguínea utilizando o Quick Test DEA 1.1®. Imagem cedida por Alvedia®.



5. Cross-match

Em medicina humana o cross-match foi inicialmente descrito em 1907. Sendo posteriormente modificado várias vezes. As modificações incluem a realização de vários tipos de testes rápidos, desde teste em tubo até teste em gel. Estas reações devem sempre ser avaliadas por um operador treinado para garantir uma interpretação precisa (Tocci & Ewing, 2009).

Este teste pré-transfusional serológico tem como finalidade determinar a compatibilidade sanguínea entre dador e recetor permitindo seleccionar unidades que vão providenciar o máximo benefício aquando da transfusão e prolongar a duração dos eritrócitos *in vivo* (Weinstein & Sink, 2012). Todavia o cross-match não identifica incompatibilidades entre tipos sanguíneos e não identifica incompatibilidades entre proteínas, leucócitos ou antígenos plaquetários, além disso não previne a existência de reações hemolíticas ou a diminuição da sobrevivência dos eritrócitos em recetores que produzam aloanticorpos após a transfusão. De uma maneira geral, se ambos nunca tiverem recebido uma transfusão sanguínea incompatível, o cross-match entre um dador DEA 1.1 positivo e um recetor DEA 1.1 negativo irá mostrar compatibilidade devido à baixa prevalência de aloanticorpos que ocorrem naturalmente. Já no caso dos gatos, o cross-match entre um dador de tipo A e um paciente de tipo B irá resultar em incompatibilidade, ou seja, um resultado positivo, uma vez que os felídeos apresentam aloanticorpos naturais (Davidow, 2012a).

Ainda não se chegou a consenso em relação a quando fazer o cross-match. A maioria dos autores concorda que, já que não existe um número significativo de cães com aloanticorpos, se deva fazer o *cross-match* apenas quando o paciente já foi previamente transfundido (Weinstein & Sink, 2012) porque a produção de anticorpos ocorre 3-4 dias após exposição ficando detetáveis durante anos (Tocci & Ewing, 2009). Embora uma reação hemolítica aguda entre tipos sanguíneos confirmados por tipificação nunca tenha sido reportada num canídeo, durante a primeira transfusão pode ocorrer diminuição do tempo de sobrevivência de eritrócitos, devido a anticorpos que ocorrem naturalmente em alguns cães DEA 7. Uma incompatibilidade no tipo DEA 7 irá

demonstrar uma ligeira aglutinação no cross-match e incompatibilidades dos tipos DEA 3 e DEA 5 podem dar origem a reações demasiado fracas para serem observadas no *cross-match* antes da primeira transfusão (Davidow, 2012a). Quando não se visualiza reação aconselha-se observar microscopicamente uma gota da mistura, numa ampliação de 40X. Agregados ou amontoados tipo cacho de uvas são considerados uma reação incompatível (Day, 2012). Existem duas técnicas de cross-match: Major cross-match e Minor cross-match.

5.1. Major cross-match

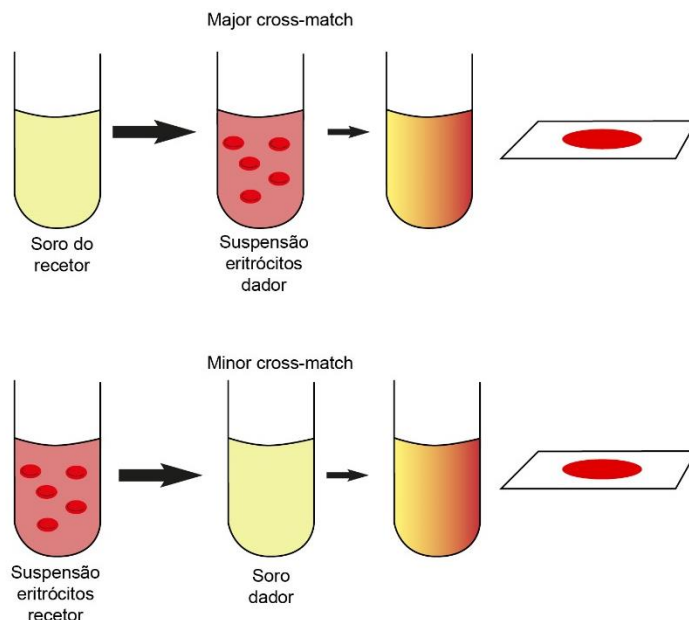
O *major cross-match* é um método serológico e testa para aloanticorpos no plasma/soro do recetor, contra os eritrócitos do dador, como está exemplificado na figura 3. O plasma do recetor é incubado com uma suspensão, de 3% a 5%, de eritrócitos do dador, em soro fisiológico, e são observados diretamente no tubo ou num microscópio para aglutinação visível. (Tocci & Ewing, 2009). O Major cross-match é a reação com maior importância, juntamente com o autocontrolo do recetor, que avalia a presença de autoaglutinação e utiliza plasma do recetor juntamente com uma suspensão de eritrócitos do recetor.

Durante muitos anos, o cross-match em tubo foi considerado o *gold standard*, porém atualmente também se utiliza o método de cross-match em gel (RapidVet®-H *Companion Animal Major Cross Match*) (Weinstein & Sink, 2012). O teste em gel está disponível na prática veterinária para cães e gatos e tem como vantagens o facto de ser menos moroso, utilizar menos amostra, está standarizado, e não requer um operador especializado. Além disso, as reações são estáveis e podem ser reavaliadas por diferentes pessoas mais tarde (Tocci & Ewing, 2009). O método em tubo é um procedimento manual, mais complexo e dependente do operador. Todavia o seu custo é muito menor (Davidow, 2012a).

5.2. Minor cross-match

É um método serológico utilizado para determinar a compatibilidade entre o plasma do dador e os eritrócitos do recetor (Figura 3). A transfusão de componentes contendo plasma, têm o potencial de causar destruição dos eritrócitos do recipiente, se o dador tiver aloanticorpos direcionados contra os antígenos na superfície dos eritrócitos do recipiente (Tocci, 2010). É então utilizada uma suspensão de eritrócitos do recetor e plasma/soro do dador. Idealmente o dador não deve ter história de antigas transfusões (Weinstein & Sink, 2012). Tal como no major cross-match, o minor-cross match pode ser realizado em tubo e gel (RapidVet®-H *Companion Animal Minor Cross Match*).

Figura 3. Imagem ilustrativa, simplificada, acerca dos procedimentos do Major e Minor cross-match em tubo.



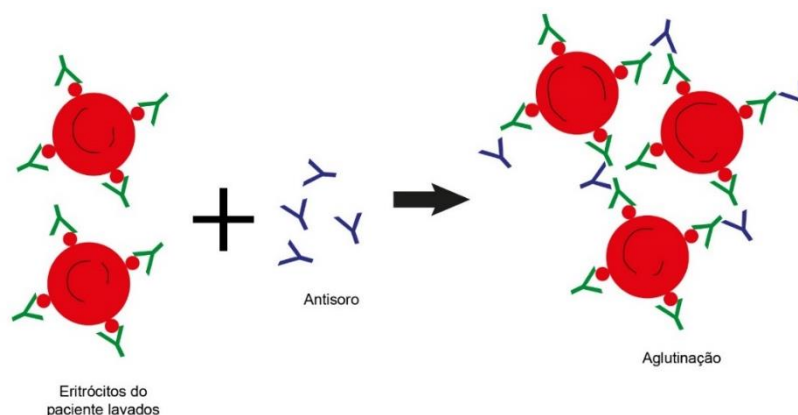
6. Teste de Coombs

O teste de Coombs consiste em dois testes com diferentes indicações: o teste de antiglobulina direta (TAD) e o teste de antiglobulina indireta (TAI). O TAD tem como objetivo detetar a presença de anticorpos (normalmente IgG ou IgM) e ou complemento ligados (Day, 2012), à superfície dos eritrócitos do paciente. O TAD recorre à utilização de uma suspensão de eritrócitos lavados que é posteriormente incubada anticorpos específicos contra a espécie em questão, o que irá provocar uma forte aglutinação (Mechanisms in Medicine, 2010). Este soro deve ser específico da espécie para dar um resultado preciso, o reagente de Coombs para a espécie canina é normalmente preparado através de caprinos (Green & Hughes, 2005). O antissoro pode ser monovalente, isto é, direcionado apenas contra uma classe de imunoglobulina como por exemplo, IgG ou IgM (Garratty, 2004). O reagente de Coombs polivalente, deteta diferentes classes de imunoglobulinas ou fragmentos de complemento. Estes dois reagentes podem ser utilizados em conjunto para descobrir a natureza da reação imune (Day, 2012). Se existir anticorpos ou complemento na superfície dos eritrócitos, adicionando o reagente de Coombs irá ocorrer uma ligação entre os eritrócitos resultando numa forte aglutinação visível ao microscópio, (TAD positivo) (Green & Hughes, 2005). Ocasionalmente é necessário proceder-se à diluição do reagente de Coombs, de forma a eliminar o efeito *prozone*, que consiste num resultado falso negativo devido a grandes concentrações de anticorpos em amostras não diluídas (Cornell

University, 2014). O TAD é indicado quando há suspeita de: reações transfusionais, AHIM, anemia hemolítica do recém-nascido ou hemólise induzida por fármacos (Mechanisms in Medicine, 2010).

O TAI testa a presença de anticorpos contra eritrócitos no soro do animal testado. É utilizado o soro do paciente, contendo, anticorpos anti eritrocitários não ligados, ao qual é adicionado um reagente contendo eritrócitos que possuem antígenos clinicamente significativos. É contra estes que os anticorpos presentes no soro do paciente se vão ligar, formando complexos antígeno-anticorpo. Posteriormente são adicionadas imunoglobulinas específicas (por exemplo, anti-caninas), que ao ligar-se aos complexos vão dar origem a uma aglutinação visível no microscópio (Mechanisms in Medicine, 2010). Este teste é menos sensível que o TAD, uma vez que em alguns animais com AHIM, todos os seus anticorpos estão ligados aos eritrócitos, podendo dar origem a um TAI negativo. Os mecanismos fisiopatológicos do TAD estão descritos na figura 4.

Figura 4. Esquema ilustrativo do princípio do teste de Coombs direto (TAD), adaptado de: Day, M.J. (2012).



7. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo constitui uma técnica bastante importante tendo sido utilizada em áreas como, imunologia, hematologia, oncologia, anatomia patológica e biologia celular (Ribeiro, 2010). Com o citómetro de fluxo é possível definir características de células ou partículas utilizando as propriedades de dispersão de luz das mesmas através da emissão de fluorescência de anticorpos marcados (Lucidi *et al.*, 2011). A principal característica dos citómetros é a sua capacidade de medir múltiplos parâmetros, não apenas de células, mas também de, cromossomas, proteínas ou ácidos nucleicos que estão ligados à partícula, desde que as partículas ou células estejam suspensas num fluido (Wilkerson, 2012).

Ao longo dos últimos 60 anos, a citometria de fluxo tem sofrido uma evolução constante. Inicialmente eram utilizados instrumentos de parâmetro único, que detetavam o tamanho das

células. Atualmente existem instrumentos que medem até 14 parâmetros de forma simultânea, com o aparecimento do FACS Aria™ de Becton Dickinson em 2003 (Wilkerson, 2012).

O primeiro separador de células ativadas fluorescentes foi descrito em 1965 e os primeiros citômetros de fluxo clínicos foram introduzidos em medicina humana em 1980. Estes foram utilizados por investigadores para definir subpopulações celulares em modelos animais de doenças humanas (Wilkerson, 2012). Inicialmente o seu uso estava restrito à área da investigação devido ao fato de estarem pouco disponíveis, estarem associados a um custo elevado e igual complexidade e por sua vez, requerem a presença de técnicos especializados no seu manuseamento (Nicholson, 2002, citado por Ribeiro, 2010). Aproximadamente em 1995 é que a citometria de fluxo começou a ser utilizada em medicina veterinária.

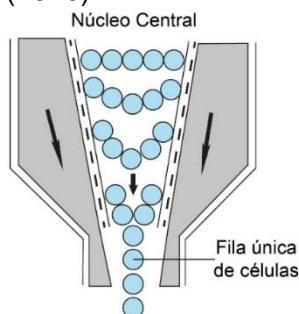
Com o aparecimento de anticorpos monoclonais puderam ser sintetizadas partículas muito específicas e sensíveis, evitando assim ligações não-específicas (Ribeiro, 2010).

7.1. Princípios da citometria de fluxo

O citômetro mede as características das células ou partículas em fluxo à medida que estas passam por uma fonte de luz, neste caso, um laser (Wilkerson, 2012).

A suspensão celular é inicialmente colocada no citômetro e esta depois irá para o núcleo central, que se encontra na câmara de fluxo, onde existe um líquido de envolvimento, uma solução salina tampão contendo fosfato. O líquido de envolvimento é injetado na câmara através de linhas pressurizadas sem entrar em contacto com a suspensão celular, como se pode observar na figura 5. É no núcleo central que as células formam um fluxo, mantendo-se alinhadas, hidrodinamicamente. Devido a diferenças de pressão entre o líquido de envolvimento e a suspensão de células, as células passam uma a uma em frente ao feixe luminoso (Ribeiro, 2010). A este conjunto de estruturas é chamado o sistema fluídico.

Figura 5. Imagem ilustrativa do funcionamento do núcleo central contido na câmara de fluxo. Adaptado de: Ribeiro, N.F.S. (2010).



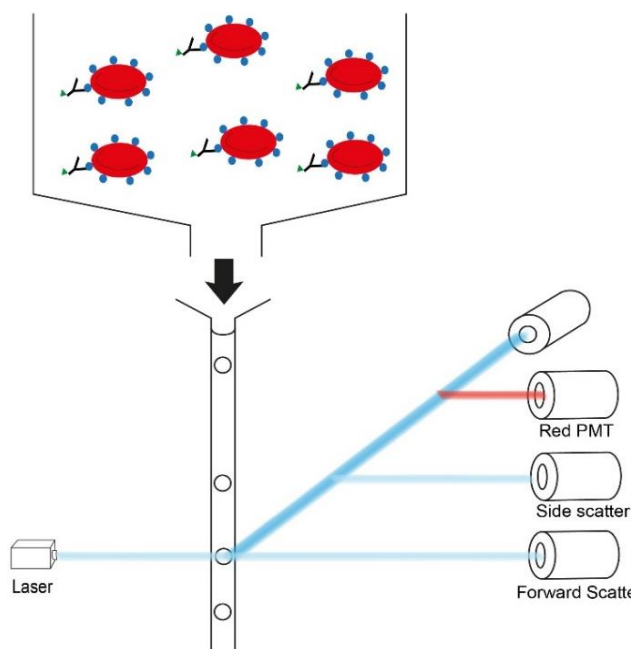
Legenda: Líquido de envolvimento é representado pela zona cinzenta.

A taxa pela qual as células em suspensão são injetados para o feixe de laser pode ser ajustada pelo operador. São utilizadas altas taxas de fluxo para a maioria das aplicações como é o caso da imunofenotipagem de células de mamíferos, ao passo que, taxas de fluxo lento são essenciais para a quantificação do teor de ácido desoxirribonucleico (ADN) nos núcleos fluorescentes corados (Wilkerson, 2012).

O sistema ótico é composto por feixes de laser e diferentes tipos de filtros, o que permite a seleção de diferentes comprimentos de onda adequados. A ótica de excitação inclui um laser, lentes e prismas para focar o feixe de laser. O sistema recetor ótico compreende uma lente para recolher a luz emitida e um sistema de espelhos e filtros óticos para dirigir os comprimentos de onda (sinais de luz) específicos aos detetores correspondentes (Wilkerson, 2012).

Como se pode observar na figura 6, a interação entre as células ou partículas e o feixe luminoso origina sinais que vão ser recebidos pelos detetores adequados. A informação recebida pode ser a que é originada pela dispersão da luz ou a relacionada com fluorescência relacionada com a emissão de luz por fluorocromos que estão ligados aos anticorpos monoclonais. A dispersão da luz consiste num processo físico em que a célula interage com a fonte luminosa e esta muda de direção. Características celulares como tamanho, membrana celular, núcleo e material granular contribuem para esta dispersão. A luz que dispersa para a frente designada de *forward scatter* (FSC) dá a informação sobre o tamanho celular. Já a luz que dispersa em ângulo reto, designada de *side scatter* (SSC) é uma medida da complexidade celular.

Figura 6. Ilustração do funcionamento do citómetro de fluxo e o seu sistema ótico. Adaptado de: Ribeiro, N.F.S. (2010).



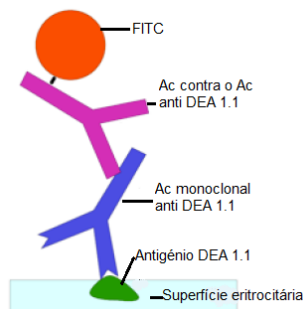
Os compostos absorvem energia da fonte luminosa, o que faz com que os seus eletrões passem a um nível mais energético. No momento em que aqueles regressam ao estado de repouso que liberta energia sob a forma de um fóton. Dependendo do comprimento de onda, existem diferentes fotomultiplicadores (PMT), podendo ser feita uma análise de parâmetros múltiplos. Também existe um digitalizador que converte a energia luminosa emitida pelos fótons, em energia elétrica e posteriormente em sinais digitais. Através de um *software* específico de análise, os dados irão ser representados através de gráficos, histogramas (monoparamétrico) ou citogramas (biparamétrico) em que uma ou mais populações de células e as propriedades são avaliadas (Wilkerson, 2012).

Nas distribuições de frequência de dois parâmetros, designados citogramas, cada eixo é representando pela intensidade de fluorescência de um parâmetro diferente. Os mais comuns são as distribuições de frequência de pontos (*dot plots*), onde cada ponto representa uma partícula analisada (célula), neste caso eritrócitos, e a distribuição de pontos, para visualizar as contribuições relativas de cada região, varia de intensidade de fluorescência. A utilização da representação bidimensional permite estabelecer, visualmente, a correlação entre dois parâmetros. Outra característica da análise de citometria de fluxo de dados é a utilização de janelas de análise (*gates*), que são ajustadas, sendo, por isso, utilizadas para selecionar especificamente a população de células ou partículas de interesse, em que os parâmetros utilizados são a *forward scatter* e a *side scatter*.

7.1.1. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem consiste na deteção de células com antígenos celulares específicos, através da sua incubação com anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. O fluorocromo mais utilizado é o Isotiocianato de fluoresceína (FITC). Quando é incidida uma fonte luminosa nos antígenos marcados com anticorpos monoclonais é então emitida uma fluorescência. Na figura 7 é possível observar a estrutura da técnica de imunofenotipagem.

Figura 7. Esquema acerca da imunofenotipagem utilizada em hematologia para deteção do tipo sanguíneo DEA 1.1.



Como já foi explicado anteriormente, esta técnica recorre a anticorpos monoclonais, obtidos em ratinhos, específicos para o antígeno DEA 1 e a anticorpos anti-ratinho secundários aos quais é acoplado o FITC. Enquanto que o anticorpo monoclonal para a produção da tira imunocromatográfica é purificado, através da escolha do hibridoma mais eficiente, para a citometria de fluxo são utilizados os anticorpos presentes no sobrenadante (os anticorpos mais purificados estão na base do recipiente onde são produzidos) para não ocorrer aglutinação, devido à excessiva purificação do anticorpo.

8. Reações transfusionais

Qualquer efeito indesejável que ocorra após uma transfusão e que seja consequência da mesma é denominada reação transfusional. Estas reações podem ser classificadas em mediadas ou não mediadas por mecanismos imunológicos. Podem também ser classificadas em agudas ou retardadas.

8.1 Reações mediadas por mecanismos imunológicos agudas

8.1.1. Reação hemolítica

É uma reação grave muitas vezes fatal, em que a gravidade da resposta é diretamente proporcional ao número de eritrócitos destruídos. Consiste numa reação de hipersensibilidade de tipo II, isto é, mediada por IgG ou IgM do recipiente (Tocci, 2010). Estas reações são predominantemente mediadas por IgG nos cães e por IgM nos gatos (Tocci, 2010). Estes anticorpos ligam-se a antígenos nos eritrócitos do dador formando complexos imunes, que por sua vez irão ativar o sistema complemento pela via clássica. Ocorre então a formação do complexo de ataque membranário, do inglês *membrane attack complex* (MAC) (Casari, 2012) levando a uma reação que pode ocorrer nos primeiros 5 minutos após o início da transfusão. Sinais possíveis incluem hipotensão sistémica, febre, taquicardia ou bradicardia, vômito, defecação, fraqueza, dispneia, hemoglobinúria, podendo estas reações evoluir para choque, coagulação intravascular disseminada (CID) ou lesão renal (Gibson & Abrams-Ogg, 2012).

Em caso de suspeita de reação hemolítica aguda, a transfusão deve ser parada imediatamente. Deve ser confirmada a identidade e grupo sanguíneo do paciente e dador assim como a história do paciente. Devem ser recolhidas amostras do paciente e dador a fim de se proceder à tipificação, *cross-match*, teste de Coombs e cultura sanguínea, uma vez que sepsis apresenta sintomatologia similar a esta reação (Davidow, 2012b).

No caso de ocorrer hemólise, deve-se dar início a uma fluidoterapia adequada, como tratamento da hipotensão, de forma a manter fluxo sanguíneo renal adequado. O uso de glucocorticoides é controverso e estes fármacos não são, normalmente, usados em medicina humana uma vez que, embora possam minimizar a resposta inflamatória não suprimem a curto prazo a produção de IgG e IgM (Tocci, 2010).

8.1.2. Reações alérgicas

São classificadas como reações de hipersensibilidade de tipo I sendo mediadas maioritariamente por imunoglobulinas E (IgE), mas também por IgG ou IgA. Neste tipo de reação qualquer alérgeno presente no sangue do dador, como por exemplo anticoagulantes ou proteínas plasmáticas, pode desencadear reações anafilatóides no receptor. Pacientes atópicos ou que tenham recebido anteriormente transfusão apresentam um risco acrescido de apresentar este tipo de reação (Casari, 2012).

Quando o antígeno, presente no plasma do dador, entra em contacto com o paciente, previamente sensibilizado, ocorre ativação de mastócitos e basófilos por IgE, promovendo a desgranulação dos mesmos, com a libertação de mediadores vasoativos como, histamina, leucotrienos, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária e proteases, responsáveis pelo aparecimento de sinais clínicos (Davidow, 2012b). A sintomatologia de reações anafilatóides passa por prurido, urticária, angioedema facial, e nos casos mais graves, como as reações anafiláticas, sinais mais comuns são, broncoconstrição, dispneia, edema pulmonar, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, hipotensão, síncope e morte (Tocci, 2010). A transfusão de produtos do plasma contendo imunoglobulina IgA, em pacientes com deficiência desta imunoglobulina e com anticorpos anti-IgA, pode resultar em reações de hipersensibilidade aguda em humanos. Nesta, os sinais incluem vômitos, dispneia e edema pulmonar não cardiogénico (Davidow, 2012b; Tocci, 2010).

No caso de ocorrer uma reação ligeira pode ser administrado um anti-histamínico como a difenidramina na dose de 1-2 mg/kg via oral (Ramsey, 2011) e a velocidade da transfusão reduzida (Casari, 2012). Em reações mais graves epinefrina 1:1000 deve ser administrada, numa dose de 20 µg via endovenosa (Ramsey, 2011). Nestes casos a transfusão deve ser interrompida imediatamente.

8.1.3. Reações febris não hemolíticas

É considerada por Davidow (2012b) como uma das reações transfusionais mais frequentes. Esta é definida como o aumento da temperatura corporal em 1°C a 2°C durante algumas horas após a transfusão, normalmente 1 a 2 horas (Tocci, 2010).

Estas reações podem ocorrer devido à produção de citocinas, libertadas por monócitos do paciente, quando em contato com os antígenos do dador, ou pela presença de citocinas pirogênicas e/ou outros mediadores inflamatórios acumulados no saco durante a colheita e armazenamento (Casari, 2012). Esta situação pode ser reduzida se forem utilizados filtros de leucorredução antes do armazenamento do produto sanguíneo. Porém o custo elevado destes impede que a sua utilização seja uma prática geral em medicina veterinária (Davidow, 2012b).

Uma vez que, a febre pode constituir um sintoma inicial de hemólise imunomediada ou ser o resultado de contaminação bacteriana da unidade, é importante que a temperatura seja monitorizada durante a transfusão (Gibson & Abrams-Ogg, 2012). Como tratamento das reações febris não hemolíticas, deve reduzir-se a velocidade da transfusão e ser administrado um anti-inflamatório não esteróide (AINE) (Tocci, 2010).

8.1.4. Lesão pulmonar aguda associada a transfusão

Do inglês, *transfusion related acute lung injury* (TRALI), em medicina humana constitui uma complicação pós-transfusional grave, sendo definida como desenvolvimento de edema bilateral, em pacientes sem lesão pulmonar aguda pré-existente, acompanhada de febre e hipotensão 1 a 6 horas após a transfusão de um produto sanguíneo contendo plasma. A TRALI tem uma apresentação semelhante ao *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) (Tocci, 2010). Recentemente, foi reconhecido que TRALI pode surgir de forma tardia, nas 6-72h após a transfusão, principalmente em doentes críticos. A TRALI deve ser diferenciada de edema pulmonar cardiogénico ou hipervolemia. A fisiopatologia ainda não é totalmente conhecida, mas foi sugerida que resulta de mecanismos imunomediados e não imunomediados. No mecanismo imunomediado, há a formação de agregados celulares compostos por granulócitos do paciente e anticorpos leucocitários do dador, levando ao desenvolvimento de um edema pulmonar com elevada concentração proteica (Davidow, 2012b; Tocci, 2010). Embora não tenham sido reportados casos clínicos de TRALI em medicina veterinária, foi sugerido que esta condição também possa ocorrer em pacientes veterinários, sendo subdiagnosticada (Casari, 2012). O tratamento requer oxigenoterapia e em casos graves ventilação mecânica.

8.2. Reações imunomediadas tardias

Podem ocorrer entre 2 a 21 dias pós-transfusão. Os em que os sinais são semelhantes aos da reação hemolítica aguda, contudo, por norma, menos graves (Gibson& Abrams-Ogg,2012).

8.2.1. Reação hemolítica

O hematócrito do paciente diminui rapidamente entre 3 a 5 dias pós-transfusão. Numa reação hemolítica tardia, o paciente que recebe a transfusão produz anticorpos contra os eritrócitos recebidos, pouco depois de estes entrarem em contacto com o antígeno do dador (Casari,2012). Os anticorpos, ao aderirem às células do dador vão fazer com que estas sejam removidas prematuramente da circulação (Graça,2012). Estes anticorpos não são detetados no cross-match, uma vez que, antes da transfusão encontram-se em baixas titulações (Tocci,2010; Weinstein & Sink,2012).

A descoberta de um novo anticorpo anti eritrocitário, num paciente que recebeu uma transfusão recentemente e cujo hematócrito está a descer, sugere hemólise retardada (Tocci,2010).

8.2.2. Púrpura pós-transfusional

Segundo Weinstein (2010) este tipo de reação é rara ocorrendo quando os anticorpos, formados após transfusões prévias, atacam as plaquetas do paciente, levando a uma trombocitopenia, normalmente, na semana após a transfusão (Gibson & Abrams-Ogg,2012).

Sintomatologia desta reação compreende, petéquias e em de situações mais graves, pode mesmo ocorrer hemorragias espontâneas (Graça 2012).

8.2.3. Isoeritrólise Neonatal (IS)

Também designada doença hemolítica do recém-nascido, tem um significado clínico importante em gatos (Day & Mackin,2008 citado por Day,2012). É uma reação tão importante que inclusive criadores estão familiarizados com esta questão, tipificando todos os reprodutores com o intuito de prevenir a IS (Day,2012).

Esta doença é causada por incompatibilidade entre o sangue fetal e o da mãe, resultando na destruição dos eritrócitos do feto por aloanticorpos maternos. A IS ocorre quando uma gata tipo B tem filhos tipo A ou tipo AB. Como a mãe possui títulos elevados de anticorpos anti-A, estes vão ser transferidos, aos filhos, passivamente, através do colostro (Graça,2012), causando uma anemia hemolítica no recém-nascido. Esta ocorre nas 48 horas após o nascimento causando sinais clínicos como, icterícia, hemoglobinúria, fraqueza e até morte. Existe ainda uma forma

subclínica desta doença, manifestada pela necrose da ponta da cauda, aproximadamente, três semanas após o nascimento (Day,2012).

8.3. Reações agudas não mediadas por mecanismos imunológicos

Na sua maioria, as reações não mediadas por mecanismos imunológicos ocorrem devido a um, exame físico incompleto e má pesquisa de doenças infecciosas do dador assim como a deficiente colheita, preparação, manuseamento, armazenamento e administração dos produtos (Gibson & Abrams-Ogg,2012).

8.3.1. Hipervolemia

A hipervolemia constitui uma reação importante, referida como *transfusion associated circulatory overload* (TACO) na literatura anglo-saxónica. Os produtos sanguíneos são considerados fluidos coloides naturais levando a um grande aumento de volume (Davidow,2012b). Esta hipervolemia ocorre principalmente em doentes com doença cardíaca ou renal (Gibson & Abrams-Ogg,2012), embora também ocorra em pacientes normovolémicos, se a velocidade de transfusão for demasiado elevada. A taxa de administração da transfusão depende do estado cardiovascular do paciente. No entanto, de uma forma geral, normalmente a taxa de administração é de 0,25 a 1 ml/kg/h nos primeiros 20 minutos e se esta for bem tolerada, pode administrar-se o restante volume em 4 horas. A maioria dos pacientes recebe entre 10 a 22 ml/kg de produto sanguíneo porém existem uma fórmulas que calculam a quantidade de ST a ser administrada, sendo apresentada uma dessas fórmulas de seguida.

Fórmula 1.Fórmula utilizada para o cálculo do volume de sangue total a administrar, adaptado de: Gibson & Abrams-Ogg,2012

$$Volume(ml) = 85 \times peso(kg) \times \frac{Ht\ desejado - Ht\ atual}{Ht\ dador}$$

Os sinais clínicos da sobrecarga de volume incluem dispneia, cianose, aumento da pressão venosa central e edema pulmonar. O tratamento consiste em parar a transfusão, iniciar oxigenoterapia e ponderar diuréticos. Em casos graves também se pode proceder a uma flebotomia (Tocci,2010).

8.3.2. Sépsis

Em medicina humana, 16% dos recetores de transfusões sanguíneas faleceram devido a contaminação bacteriana de componentes sanguíneos entre 1986 e 1991 (Tocci,2010). Por conseguinte é de extrema importância que todo o processo, desde colheita até a administração de produtos sanguíneos, seja feito com uma técnica asséptica. Os organismos que se multiplicam em componentes sanguíneos refrigerados, são sobretudo microrganismos psicrófilos gram-negativos. Os microrganismos gram-positivos são mais frequentes em produtos plaquetários armazenados à temperatura ambiente (Tocci,2010) Tal como foi referido anteriormente, é difícil distinguir, numa fase inicial, a reação hemolítica aguda de uma reação séptica. Assim em caso de suspeita devem ser obtidas amostras, do paciente e dador, para se proceder à tipificação, *cross-match*, teste de Coombs e cultura do produto sanguíneo. Os sinais de sépsis incluem a febre, hipotensão e hipoglicémia, podendo evoluir para CID (Davidow,2012b).

8.3.3. Hemólise

Pode ocorrer hemólise naquelas unidades sanguíneas submetidas a mau manuseamento e/ou temperaturas extremas. Quando o produto é administrado o recipiente pode desenvolver hemoglobinúria. Esta não é prejudicial porém as unidades de sangue não exercem o efeito desejado. É importante diferenciar de uma reação hemolítica imunomediada e para tal é aconselhável realizar-se uma amostra do produto sanguíneo (Davidow, 2012b).

8.3.4.Embolismo gasoso

Este ocorre quando o sistema aberto está em infusão sobre pressão ou se ar entra no cateter central. Segundo Tocci (2010) o volume mínimo de ar potencialmente fatal para um ser humano adulto é de 100 ml, pelo que o uso adequado de bombas infusoras e pinças durante a mudança de sistemas previne esta complicação. São sinais de embolismo gasoso os seguintes: tosse, dispneia e choque.

8.3.5. Intoxicação por citrato

Ocorre quando se administram rapidamente produtos sanguíneos que contenham CPD ou ACD. Como estes contêm citrato, que é quelante do cálcio pode ocorrer hipocalcémia. Esta ocorre principalmente em pacientes com hepatopatias (Gibson & Abrams-Ogg,2012). Os sinais de hipocalcémia incluem vômitos, tremores musculares, tetania e alterações no eletrocardiograma. Para o diagnóstico desta devem ser avaliados os valores do cálcio ionizado. Para o seu

tratamento deve ser administrado gluconato de cálcio na dose de 50 a 100 mg/kg por via endovenosa, numa solução de 10% ou cloreto de cálcio numa dose de 5 a 10 mg/kg via endovenosa, numa solução de 10%. Qualquer uma destas soluções deve ser administrada em infusão lenta (Ramsey,2011).

8.3.6. Hiperamonemia

Esta pode ocorrer em pacientes com hepatopatias a quem são administrados produtos sanguíneos armazenados, que tendem a armazenar amónia. Como tal em doentes hepáticos deve optar-se por componentes sanguíneos frescos (Casari,2012). Os sinais são semelhantes aos da encefalopatia hepática (Davidow,2012b).

8.4. Reações retardadas não mediadas por mecanismos imunológicos

8.4.1. Transmissão de doenças infecciosas

Embora atualmente seja relativamente rara, a transmissão de doenças infecciosas por administração de produtos sanguíneos ocorre quando não são testados, de forma periódica, os dadores caninos e felinos para as doenças endémicas da região.

Foram publicados, recentemente, pelo *American College of Veterinary Internal Medicine*, protocolos que sugerem quais os testes a serem realizados em dadores felinos e caninos (Wardrop, 2005).

Nos canídeos, em doenças transmitidas por vetores, recomenda-se o rastreio de Babesiose, Leishmaniose e Erlichiose, enquanto que o rastreio é opcional para Bartonella e tripanossomose. Em gatos é recomendada a testagem para Micoplasmose, Bartonelose, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) (Davidow,2012b).

De uma maneira geral, essas recomendações devem ser adaptadas à situação epidemiológica na zona de residência ou de local onde os dadores tenham viajado

O sangue total e o concentrado de eritrócitos são os produtos com maior risco de transmissão de doenças infecciosas (Weinstein, 2010 citado por Graça, 2012).

PARTE II- Componente experimental

Este trabalho faz parte de um projeto de investigação acerca do seguimento de pacientes que receberam transfusão sanguínea atualmente a ocorrer no SIAMU (Soins Intensifs Anesthésiologie et Médecine d'Urgence) que pertence ao VetAgro Sup, Université de Lyon, Unidade EA_4174 em colaboração com a Dianov® e Alvedia®. Toda a informação aqui apresentada é propriedade de VetAgro Sup e Dianov® com o número de convenção 225VAL1012.

1.Objetivos

É fundamental encontrar um método de tipificação segura e confiável, de maneira a otimizar-se o funcionamento do banco de sangue e garantir a segurança aquando da transfusão. Tal é particularmente importante porque atualmente mais animais recebem transfusões múltiplas, aumentando-se assim o risco para reações transfusionais.

Todos os métodos de tipificação sanguínea têm as suas vantagens e limitações. Os métodos rápidos da Alvedia® e RapidVet®-H, embora rápidos e fáceis de realizar e interpretar podem dar origem a resultados dúbios, principalmente quando interpretados por operadores com pouca experiência.

Tanto o método de tipificação em tubo como o método de microtubos com gel podem ser considerados como testes *gold standard*, uma vez que utilizam soros de tipificação sanguínea. Estes, como dito anteriormente indicam o tipo sanguíneo ao contrário dos testes rápidos que apenas indicam a presença ou ausência do antígeno DEA 1.1. Porém, atualmente só existe soro para DEA 1.1, DEA 4 e DEA 7. Os mesmos só estão disponíveis em laboratórios de referência e a sua disponibilidade é limitada.

Idealmente, deveriam ser comparados resultados entre todos os métodos disponíveis. Neste projeto teve-se como principal objetivo estudar a viabilidade da tira imunocromatográfica, método de tipificação utilizado no banco de sangue do SIAMU, comparando os seus resultados com uma técnica quantitativa de referência, a citometria de fluxo. A comparação foi realizada através da observação das bandas presentes na tira com os histogramas obtidos pelo citómetro e o respetivo MFI (mean fluorescence intensity). O mesmo consiste numa classificação quantitativa da intensidade média de fluorescência, isto é, a razão entre a intensidade medida de MFI da amostra e do respetivo controlo negativo. Para tal, utilizaram-se amostras de dadores do banco de sangue e pacientes que receberam transfusões sanguíneas e posteriormente seguidos durante, aproximadamente 6 meses.

Tendo em conta a existência de diferentes expressões do antígeno DEA 1.1, teve-se o propósito de analisar se era possível classificar as mesmas, na tira da Alvedia® e mais uma vez, foi feita uma comparação com os resultados obtidos através da citometria de fluxo.

Foi também alvo de análise a eficácia da transfusão, estudar se era possível distinguir as células transfundidas e se há alteração de antigenicidade dos eritrócitos do paciente. Para tal, foram realizados ensaios com a tira e com a citometria de fluxo, através do seguimento dos recetores durante 6 meses, como dito anteriormente.

2. Material e métodos

2.1. População estudada

Os dadores são animais com mais de um ano de idade, pertencentes a estudantes ou funcionários do VetAgro Sup. Não há discriminação de sexo ou raça, apenas são aceites animais com peso superior a 20 kg, sem história de transfusão sanguínea, e ausência de doença intercorrente, sendo obrigatório que os resultados da pesquisa de hemoparasitas seja negativo. Os recetores são animais que compareceram no SIAMU e que necessitavam de uma transfusão, urgente, de sangue total ou concentrado de eritrócitos, independentemente da razão de apresentação. Tal como no caso dos dadores, não houve discriminação de raça ou sexo.

2.1.1. Critérios de exclusão

Não foram incluídos, no estudo, animais com idade inferior a um ano, com menos de 3 kg, sem vacinação contra esgana, parvovirose, leptospirose, parainfluenza e hepatite infecciosa canina, com história de transfusão antes do início do projeto ou hemodiálise durante a hospitalização no SIAMU.

2.2. Análise sanguíneas

2.2.1. Análises realizadas no VetAgro Sup

O hemograma foi realizado com, no mínimo, 1 ml de sangue total em ácido etilenodiamino tetraacético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) recorrendo ao Laser Cyte IDEXX® no SIAMU ou ao ABC Vet Scill® no departamento de hematologia.

O microhematócrito foi efetuado com 0,5 ml de sangue total em heparina colocado num microtubo capilar, centrifugado e classificado através de uma escala específica.

As proteínas totais foram determinadas através do refratómetro (refratómetro, Atago, Japão), recorrendo-se ao soro contido no microtubo capilar utilizado para determinação do microhematócrito

Ocasionalmente também eram realizadas análises bioquímicas através do Vet Test, IDEXX® no SIAMU.

Tipificação sanguínea com a tira da Alvedia® era realizada no SIAMU recorrendo ao sangue total em heparina. As respetivas instruções de realização do teste e sua interpretação estão apresentadas no anexo 2.

SNAP® 4Dx® Plus Test é um teste rápido que foi efectuado para despiste de algumas doenças transmitidas por vectores: doença de Lyme, Anaplasmosse, Erlichiose e Dirofilariose. Tendo em vista a situação epidemiológica da região de Rhône -Alpes e, por razões financeiras, não foi feito o despiste para todas as doenças infecciosas mas foi averiguada a área de residência do dador assim como garantido que este não viajou ou morou em nenhuma área endémica.

2.2.2. Análises realizadas por Dianov®

Para a tipificação em tubo foi utilizado sangue total em CPD e tipificado utilizando-se anti soro DEA 1, DEA 4 E DEA 7.

A análise com citometria de fluxo foi realizada para definir a intensidade da expressão antigénica do DEA 1. Para esta recorreu-se a sangue total em CPD. Os procedimentos da técnica da citometria de fluxo estão descritos no anexo 4. Neste estudo tem maior importância a análise dos histogramas, uma vez apenas é analisado o nível de expressão do antígeno DEA 1 na superfície dos eritrócitos. A partir do resultado no histograma, é obtido o MFI, que representa a média geométrica da fluorescência na população DEA. É então, evidenciada, a percentagem de células marcadas e por conseguinte a percentagem de moléculas fluorescentes, uma vez que, quanto maior o MFI maior é a quantidade de anticorpos secundários acoplados. Assim é também demonstrada a relação entre o MFI e a intensidade antigénica, uma vez que quanto maior o MFI mais elevada é a intensidade antigénica.

Para o teste de antiglobulina direta recorreu-se a sangue total em CPD.

O teste de antiglobulina indireta foi realizado com sangue total e plasma em EDTA ou CPD.

2.3. Classificação da intensidade da expressão antigénica pela tira da Alvedia ®

Relativamente aos dadores, foi pedido, aleatoriamente, a 5 alunos finalistas do VetAgro Sup, que classificassem a intensidade da linha demonstrada na tira imunocromatográfica com o intuito de

analisar se a classificação através da tira é uma interpretação subjetiva. Uma vez que, os alunos não possuem muita experiência diminuiu-se o número de categorias: forte, normal e fraco.

2.4. Procedimentos em dadores

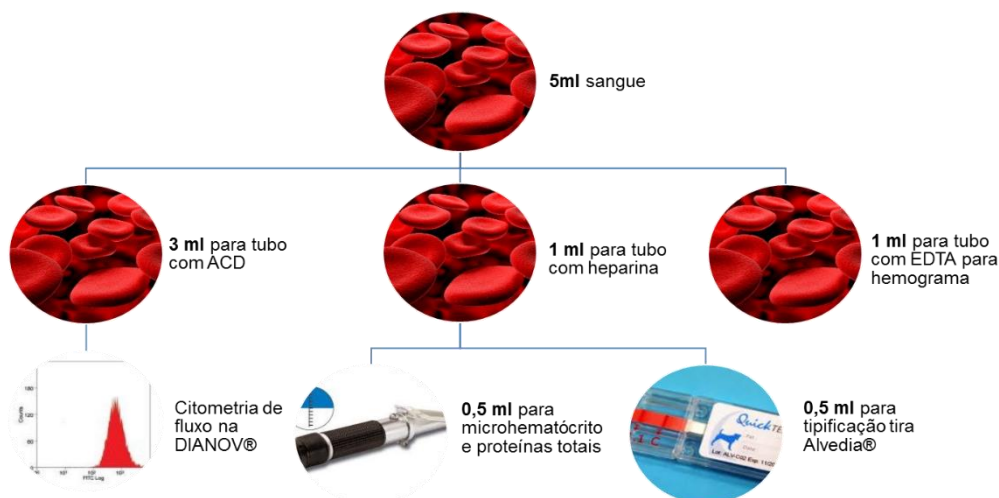
2.4.1. Antes da doação de sangue

Em primeiro lugar foi efetuado um exame físico completo.

Como se pode ver na figura 8 é retirada uma amostra de 5 ml no total, em que 3 ml de sangue total vai para um tubo com ACD e enviada no máximo até 72 horas a 4°C para a Dianov®. Coloca-se 1 ml de amostra num tubo com heparina e posteriormente retirado 0,5 ml para um microtubo capilar e centrifugado (5 min a 3000 r/min) para depois ser medido o hematócrito e as proteínas totais através do refractómetro, os restantes 0,5 ml são utilizados para fazer a tipificação com a tira da Alvedia®. Uma parte da amostra, 1 ml de sangue total, é colocada num tubo com EDTA para se realizar o hemograma, no máximo, 30 min após a colheita através do LaserCyte® ou ABC Vet Scill® se o laboratório do departamento de hematologia estiver aberto.

Finalmente são arquivados os resultados obtidos na ficha do dador.

Figura 8. Diagrama representativo de procedimentos realizados em dadores e pacientes.



2.4.2. Doação de sangue

O protocolo de sedação é: Dexmedetomidina, (1µg / kg IV) e butorfanol (0,2 mg / kg IV) a não ser que exista história de uma reação anormal a qualquer um destes compostos.

Quanto ao material, este consiste em material de assepsia tal como sabão e solução à base de cloro-hexidina, álcool e compressas esterilizadas. Também é necessário uma tosquiadora para se proceder à tricotomia da zona a puncionar, luvas esterilizadas para o operador, saco de colheita

simples para sangue total (Referência: MSE3500Q, Macopharma, França), saco de colheita com saco satélite para se obter posteriormente concentrado de eritrócitos (Referência: MRT6280Q, Macopharma, France), 1 tubo seco, 1 tubo com ACD, 1 tubo com heparina e 1 tubo com EDTA. O dador foi sedado com o protocolo descrito anteriormente, posicionado em decúbito lateral numa superfície alta e feita a tricotomia e assepsia junto da veia jugular.

Para a colheita é “sangrado” o sistema que inclui o saco para que existe anticoagulante desde a agulha até ao saco, é feito o garrote da veia jugular e inserida a agulha, no sentido cranial, na veia jugular. Com a ajuda da gravidade, uma vez que, o saco se encontra numa posição abaixo do dador, o sangue flui para o saco que está a ser segurado e constantemente misturado por outro operador. Quando se obtém a quantidade de sangue pretendida, deve-se parar a compressão da veia e retirar a agulha, seguidamente deve-se esperar que o sangue flua pelo sistema e entre no saco, sem que entre ar e prender bem o tubo o mais perto possível do saco.

Após a colheita, a sedação é revertida com a administração de atipamezol, (5-6 µg / kg IM). Quando o dador está acordado, oferecer água e comida

Figura 9. Material necessário à doação de sangue.



Tronothane®¹- Anestésico local, princípio ativo: procaína.

2.4.3. Preparação dos produtos sanguíneos

Para a preparação de concentrado de eritrócitos é necessário a centrifugação e separação dos mesmos. Os sacos eram postos nos reservatórios e equilibrados para depois se proceder à centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos, a uma temperatura de 2°C a 6°C (centrifuga JouanK110, França). O plasma é posteriormente extraído do saco e os sacos identificados com a seguinte informação: tipo de produto sanguíneo, nome do dador, tipo sanguíneo e data da colheita. O concentrado de eritrócitos é depois armazenado durante 35 dias a uma temperatura de 4°C, o sangue fresco total é utilizado para transfusão imediata, o sangue total é armazenado durante 30 dias a uma temperatura de 4°C e o plasma congelado a uma temperatura de -20°C.

2.5. Procedimentos em recetores

2.5.1. Antes da transfusão

Os procedimentos anteriormente à transfusão são semelhantes aos realizados aos dadores. A única diferença é o registo dos resultados obtidos, que são anotados numa ficha específica de admissão do paciente, dia 1, (D1) e completar a mesma.

2.5.2. Transfusão

Especificar na ficha o produto transfundido e em caso de múltiplas transfusões com diferentes dadores, devem ser incluídas as quantidades utilizadas de cada dador e a informação contida em cada saco (nome do dador, tipo sanguíneo e data da colheita).

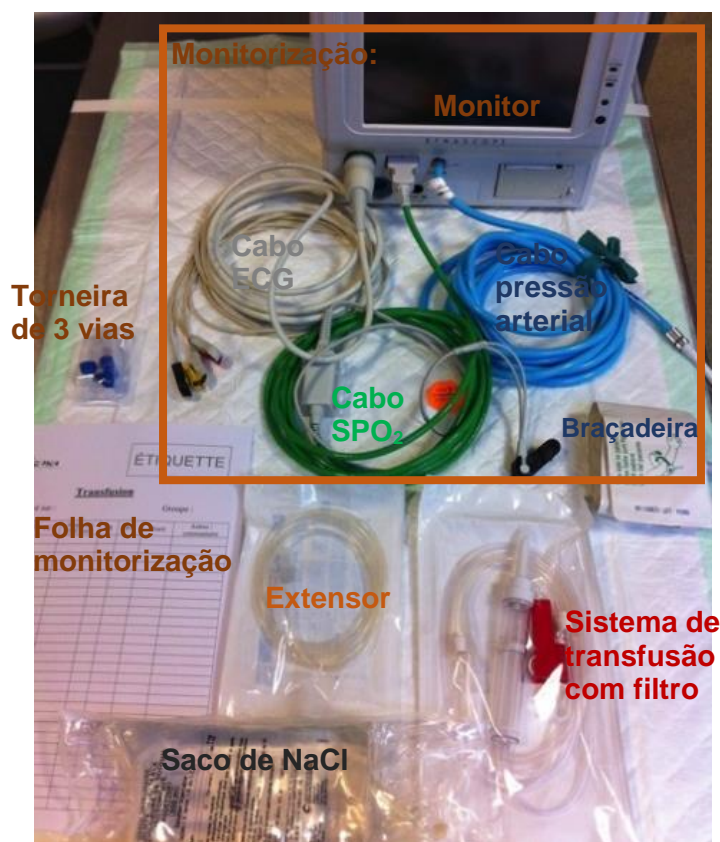
Quanto ao material, é necessário, o produto sanguíneo, no qual deve ser analisado a compatibilidade do tipo sanguíneo, a data de validade e a integridade do saco. É essencial um sistema de transfusão com filtro incluído, saco de NaCl 0.9%, torneira de 3 vias, extensor, monitor, cabos de Eletrocardiograma (ECG) e pressão arterial e ficha de monitorização da transfusão.

A monitorização é efetuada com a ajuda dos aparelhos (especificados no quadrado existente na figura 9) e conectada uma infusão de NaCl 0,9% com a ajuda do extensor e torneira de 3 vias.

A transfusão propriamente dita, foi iniciada a uma taxa de 1 ml /kg /h para o derivado sanguíneo e de 2 ml/ kg/ h para NaCl 0.9%. Durante a primeira meia hora, monitorizar o paciente a cada cinco minutos e anotar na ficha de monitorização. Após a primeira meia hora, pode-se ir aumentando regularmente a taxa de infusão da transfusão e monitorizar cuidadosamente os parâmetros da avaliação física até ao final da transfusão. Após o término da transfusão conetar um saco de 100 ml de NaCl no mesmo acesso da transfusão, a uma taxa semelhante à do fim da

transfusão. Retirar todo o material referente à transfusão e deixar o paciente com fluidoterapia. A duração da transfusão não deve ultrapassar as 4 horas.

Figura 10. Material necessário à transfusão sanguínea



2.5.3. Monitorização do paciente pós-transfusão

Foram medidos o hematócrito e as proteínas totais, uma hora após o fim da transfusão, e o paciente monitorizado para sinais de reação transfusional.

2.5.4. Seguimento pós- transfusão D1+ 24h

O seguimento de uma doença hematológica é, normalmente, feito no departamento de hematologia, onde existem consultas com o especialista uma vez por semana, e reportado ao SIAMU. Tal acontece uma vez que o SIAMU apenas recebe urgências ou animais em estado crítico que estejam a necessitar de cuidados intensivos.

O seguimento consiste no mesmo protocolo realizado para doadores e recetores pré-transfusão, onde são retirados 5 ml de sangue, como descrito anteriormente. A diferença está no registo dos resultados que são anotados na ficha do recipiente D1 + 24h.

2.5.5. Seguimento pós- transfusão D1+ 1/2 meses

Este seguimento é efetuado da mesma forma que o referente às 24h após transfusão, com a diferença que o registo dos resultados é efetuado noutra ficha, específica de D1 + 1/2 meses

2.5.6. Seguimento pós-transfusão D1+ 4/6 meses

Os procedimentos para este seguimento são realizados da mesma maneira que os procedimentos efetuados anteriormente. À semelhança do que ocorreu previamente, existe uma ficha específica, D1 + 4/6 meses.

3.Resultados

Através da tira imunocromatográfica da Alvedia®, utilizando anticorpo monoclonal, classificou-se, visualmente, a expressão antigénica em 4 categorias, com níveis crescentes de intensidade: muito fraca, fraca, normal e forte. As categorias estão especificadas na figura 10.

Figura 11. Imagem esquemática acerca dos diferentes níveis de expressão antigénica demonstrados no tipo sanguíneo DEA 1 positivo pela tira imunocromatográfica da Alvedia®. Imagem cedida por: Alvedia®.



A citometria de fluxo, representa a informação sob a forma de distribuições de frequência ou como histogramas. Nos histogramas (monoparamétricos) o número de células (eventos) é mostrado no

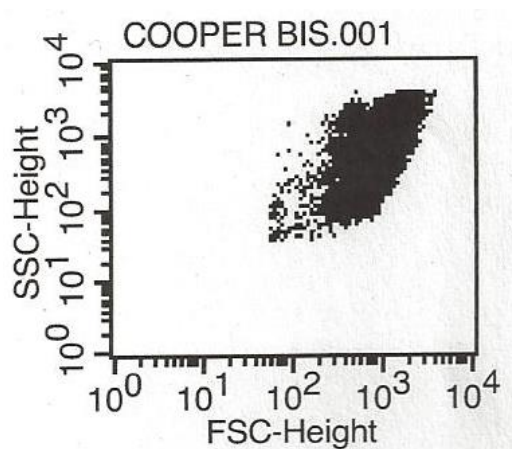
eixo das ordenadas (y) em função da intensidade de fluorescência de um parâmetro, contida no eixo das abcissas (x).

Tal como nas tiras da Alvedia®, consoante o valor de MFI a expressão antigénica é classificada em 4 níveis: muito fraca ($0 > \text{MFI} > 50$), fraca ($50 > \text{MFI} > 150$), normal ($150 > \text{MFI} > 350$) e forte ($\text{MFI} > 350$), com, um $\text{MFI} = 0$ significa que o tipo sanguíneo é DEA 1 negativo, tal como se pode ver na tabela 5.

Tabela 5. Tabela representativa das diferentes classificações da intensidade da expressão antigénica pela citometria de fluxo.

Classificação	MFI
Forte	>350
Normal	150-350
Fraco	50-150
Muito fraco	0-50
DEA 1 negativo	0

Figura 12. Exemplo de um citograma de um dador do banco de sangue com tipo DEA 1 positivo forte. Imagem cedida por: Alvedia®.



Legenda: Distribuição de frequência de pontos (*dot plots*), onde cada ponto representa uma partícula analisada (célula), neste caso eritrócitos. Os parâmetros utilizados são o *side scatter*, mostrado no eixo das ordenadas (y) e o *forward scatter* no eixo das abcissas (x). Os pontos estão contidos todos na mesma zona, uma vez que se trata de uma suspensão de eritrócitos, todos vindos de um único animal, apresentando, todos os eritrócitos, a mesma expressão antigénica.

3.1. Caracterização do banco de sangue

Os resultados obtidos pela tira da Alvedia® e pela citometria de fluxo dos dadores do banco de sangue estão especificados nas duas tabelas seguintes (tabela 5 e 6).

Tabela 6. Tabela com informação de todos os dadores do tipo sanguíneo DEA 1 positivo, do banco de sangue do SIAMU.

Nome	Raça	Idade	Sexo	Alvedia®	Classificação ¹	MFI	Classificação ²
ARKO	Pastor Belga	8	M	DEA1+	Normal	338	Forte
BALIA	Labrador x Border	2	F	DEA1+	Normal	445	Forte
BROOKLYN	Golden retriever	7	M	DEA1+	Forte	516	Forte
COOPER	X Labrador	6	M	DEA1+	Forte	447	Forte
DALI	Bouvier bernois	5	M	DEA1+	Forte	753	Forte
DENWEN	X Braco	5	M	DEA1+	Forte	326	Forte
DJANGO	Bouvier bernois	5	M	DEA1+	Normal	214	Normal
ECUELLE	Labrador	4	F	DEA1+	Muito fraco	222	Normal
EIKO	Samoiedo	4	M	DEA1+	Fraco	60	Fraco
ELSIE	Border collie	4	F	DEA1+	Forte	382	Forte
ENJOY	Collie	4	F	DEA1+	Fraco	228	Normal
FLIP	Labrador x Dálmata	3	M	DEA1+	Forte	690	Forte
FOLDINGUE	Pastor belgax	3	F	DEA1+	Forte	609	Forte
FOO-LAN	Rottweiler	3	F	DEA1+	Fraco	55	Fraco
FOREZ	Labrador	1	F	DEA1+	Fraco	147	Fraco
GALICE	Golden retriever	2	F	DEA1+	Normal	170	Normal
GAMELLE	X Pastor-de-beauce	2	F	DEA1+	Forte	495	Forte
GET	Boiadeiro de Appenzell	2	M	DEA1+	Fraco	52	Fraco
GETBACK	X Border collie	2	F	DEA1+	Normal	253	Normal
GINKO	Border collie	2	M	DEA1+	Normal	954	Forte
GOYA	Labrador x Border	2	F	DEA1+	Normal	316	Normal
GRATOUILLE	Border collie	2	M	DEA1+	Forte	356	Forte
GUYANE	X Dobermann	2	F	DEA1+	Normal	304	Normal

HEAVEN	Golden retriever	1	M	DEA1+	Forte	410	Forte
HULK	Border collier	1	M	DEA1+	Fraco	288	Normal
LULU	Labrador	3	F	DEA1+	Muito fraco	397	Forte
PEPITE	Setter gordon	3	F	DEA1+	Fraco	122	Fraco
SAFRAN	Epagneul breton	12	M	DEA1+	Forte	389	Forte
SUERTE	Dálmata	7	F	DEA1+	Forte	568	Forte
VIRGULE	Pastor australiano	4	M	DEA1+	Forte	503	Forte
WILLOW	X Dogue alemão	7	F	DEA1+	Normal	253	Normal

Legenda: X- raça cruzada; M- macho; F-fêmea; DEA- *Dog erythrocyte antigen*; Classificação¹ é referente à classificação da expressão antigénica através da tira imunocromatográfica e a classificação² alusiva à classificação da expressão antigénica através da citometria de fluxo, com o resultado em MFI.

Tabela 7. Tabela com informação de todos os dadores do tipo sanguíneo DEA 1 negativo, do banco de sangue do SIAMU

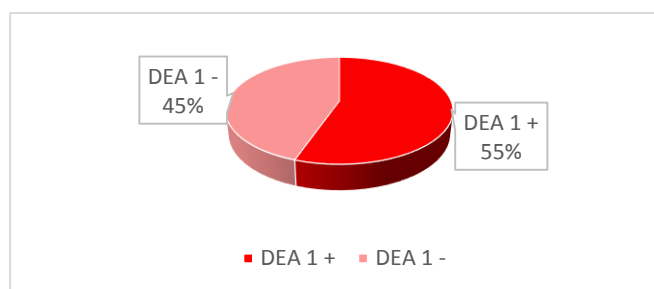
Nome	Raça	Idade	Sexo	Alvedia®	MFI
ASHKA	Golden retriever	8	F	DEA1-	0
BLOODY	X Pastor alemão	6	F	DEA1-	0
CANNELLE	Border collie	3	F	DEA1-	0
CHUTNEY	Springer spaniel inglês	6	M	DEA1-	0
CROC-DUR	Border collie	6	M	DEA1-	0
DAIKO	Samoiedo	5	M	DEA1-	0
DELTON	Cane corso	5	M	DEA1-	0
DEMRON	Pastor alemão	3	M	DEA1-	0
DJENKA	Dogue argentin	5	F	DEA1-	0
EDDY	Pastor alemão	4	M	DEA1-	0
EUSKADI	Border collie	4	M	DEA1-	0
FANDJI	X Bouledogue	3	F	DEA1-	0
FAST ERISTOFF DU BOIS	Pastor branco suíço	3	M	DEA1-	0
FETIA	Pastor australiano	3	F	DEA1-	0
FLINT	Pastor branco suíço x Husky	3	M	DEA1-	0
FLY	Collie	3	M	DEA1-	0

GAMBO	Labrador	2	M	DEA1-	0
GHALIYA	Border collie	2	F	DEA1-	0
GIN	Pastor alemão	2	F	DEA1-	0
HELIA	American staffordshire	4	F	DEA1-	0
LOVE ME BABY	X Labrador	3	M	DEA1-	0
MANOUCHE	X Pastor australiano	4	F	DEA1-	0
MELLOW	Pastor alemão	5	M	DEA1-	0
PRALINE	Pastor alemão	1	F	DEA1-	0
ZAZOU	X Pastor alemão	2	F	DEA1-	0

Legenda: X- raça cruzada; M- macho; F-fêmea; DEA- *Dog erythrocyte antigen*; MFI- mean fluorescence intensity

Atualmente existem 56 dadores no banco de sangue do SIAMU, em que 31 são DEA 1 positivos (FR=55%) e 25 são DEA 1 negativos (FR=45%). Em 100% dos casos houve concordância na tipificação sanguínea (tipificação em DEA 1 positivo ou DEA 1 negativo) pela tira da Alvedia® e pela citometria de fluxo.

Gráfico 1. Distribuição do tipo sanguíneo DEA 1 positivo e DEA 1 negativo no banco de sangue do SIAMU.



A idade média dos dadores é 3,8 anos, sendo que o dador mais novo tem 1 ano e o mais velho tem 12.

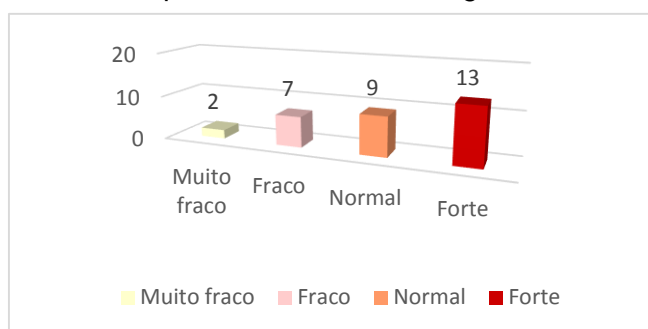
Quanto ao sexo, no total são 28 machos (FR=50%) e 28 fêmeas (FR=50%), em que, do tipo DEA 1 positivo 16 são fêmeas (FR=52%) e 15 são machos (FR=48%), enquanto que, no tipo DEA 1 negativo 12 são fêmeas (FR=48%) e 13 são machos (FR=52%).

Dos 56 animais, 8 pertenciam à raça *Border collie*, (FR= 13%), sendo esta a raça mais comum no banco de sangue, 4 eram DEA 1 positivo (FR= 50%) e 4 eram DEA negativo (FR= 50%), segue-se o Pastor Alemão com 5 animais (FR=8%), todos eles DEA 1 negativos. As raças *Golden*

Retriever e Labrador possuem 4 animais cada (cada raça com FR=7%) e a maioria dos dadores, destas raças, são DEA 1 positivos, na medida em que, 3 *Golden Retriever* e 3 Labradores são DEA 1 positivos (FR=75%) e os dois restantes (1 *Golden Retriever* e 1 Labrador) são DEA 1 negativos (FR=25%). As raças *Bouvier berinois*, Samoiedo, cruzado de Pastor Alemão, cruzado de Labrador, Pastor Australiano, *Collie*, cruzado de Labrador com *Border* são representadas por dois animais cada (FR= 4%). As restantes raças estão representadas apenas por um animal cada (FR= 37%).

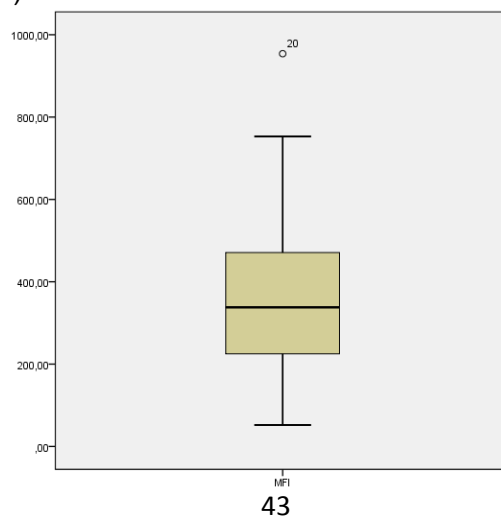
Relativamente à intensidade da linha demonstrada na tira imunocromatográfica, dos animais DEA 1 positivos, 2 animais têm uma expressão antigénica muito fraca (FR= 6%), 7 são considerados fracos (FR=23%), 9 normais (FR= 29%) e 13 fortes (FR=42%). Observar gráfico 2.

Gráfico 2. Distribuição da expressão antigénica do tipo sanguíneo DEA 1 positivo dos dadores do banco de sangue do SIAMU pela tira imunocromatográfica



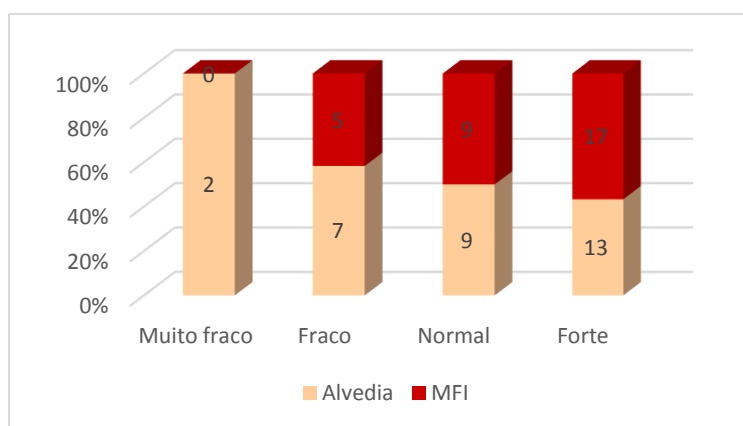
Em relação ao MFI, nos animais DEA 1 positivos, o valor mínimo foi de 52 e o máximo 954 e a classificação correspondente, através da citometria de fluxo, relativamente à expressão antigénica teve os seguintes resultados: 5 animais com expressão antigénica fraca (FR= 16%), 9 na categoria normal (FR=29%) e 17 com expressão forte (FR=55%).

Gráfico 3. Diagrama de extremos e quartis da variável MFI dos dadores DEA 1 positivo do banco de sangue do SIAMU (n=31).



Comparando os resultados das classificações das expressões antigénicas pela tira da Alvedia® e pela citometria de fluxo, temos, 2 animais pela tira da Alvedia® (FR= 6%) e nenhum pela citometria de fluxo caracterizadas na categoria de muito fraco. Já na categoria de fraco temos 7 determinados pela tira da Alvedia® (FR=23%) e 5 através do MFI (FR= 16%). Com expressão antigénica normal 9 animais foram descritos com esta classificação com a tira imunocromatográfica (FR= 29%) e 9 pelo MFI (FR=29%). Por fim, 13 animais (FR=42%) foram considerados “forte” pela tira da Alvedia® e 17 pela citometria de fluxo (FR=55%).

Gráfico 4. Comparação da classificação da expressão antigénica através da tira imunocromatográfica da Alvedia e a citometria de fluxo.



De seguida são apresentados os resultados obtidos pela classificação da expressão antigénica dos dadores DEA 1 positivos, pelos alunos do VetAgro Sup, através da tira da Alvedia®.

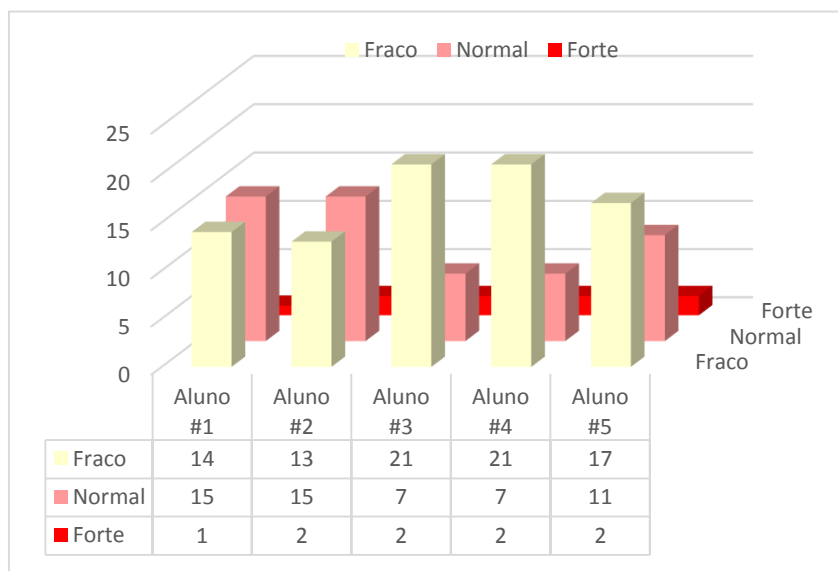
Tabela 8. Classificação dos dadores DEA 1, do banco de sangue do SIAMU, por alunos, através da tira imunocromatográfica da Alvedia®.

Nome	Classificação Aluno #1	Classificação Aluno #2	Classificação Aluno #3	Classificação Aluno #4	Classificação Aluno #5
ARKO	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
BAILA	Normal	Normal	Fraco	Normal	Normal
BROOKLIN	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
COOPER	Normal	Normal	Fraco	Fraco	Normal
DALI	Fraco	Normal	Normal	Normal	Normal
DENWEN	Normal	Normal	Normal	Fraco	Normal
DJANGO	Fraco	Normal	Fraco	Fraco	Fraco
ECUELLE	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
EIKO	Normal	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
ELSIE	Fraco	Normal	Fraco	Fraco	Fraco

ENJOY	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
FLIP	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
FOLDINGUE	Normal	Normal	Fraco	Fraco	Fraco
FOREZ	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
GALICE	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
GAMELLE	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
GET	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
GETBACK	Normal	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
GINKO	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
GOYA	Normal	Forte	Normal	Forte	Forte
GRATOUILLE	Normal	Normal	Forte	Fraco	Normal
GUYANE	Normal	Fraco	Fraco	Normal	Normal
HEAVEN	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
HULK	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
LULU	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
PEPITTE	Normal	Fraco	Fraco	Fraco	Fraco
SAFRAN	Fraco	Normal	Fraco	Fraco	Fraco
SUERTE	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte
VIRGULE	Normal	Normal	Fraco	Fraco	Fraco
WILLOW	Fraco	Normal	Fraco	Fraco	Normal

Notou-se que existem algumas diferenças na classificação, sendo que casos extremos (fraco e forte), como se pode observar, por exemplo, na categoria forte, são mais fáceis de identificar. No entanto há casos, como no animal Gratouille, em que, 3 alunos identificaram como normal, um aluno classificou como fraco e outro como forte.

Gráfico 5. Comparação da classificação da expressão antigénica dos dadores do tipo DEA 1 positivo, através da tira imunocromatográfica, por 5 alunos.



3.2. Análise dos pacientes

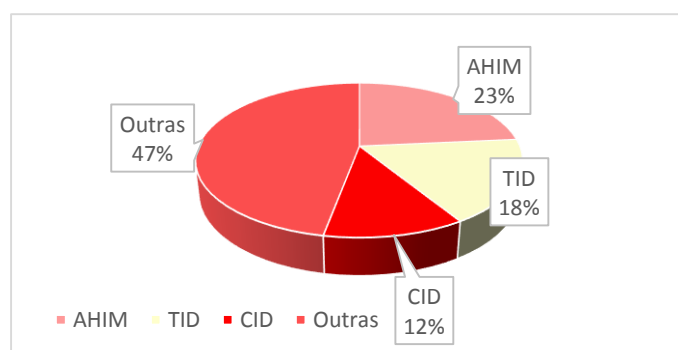
Como se pode observar na tabela 8, entre os 17 animais, a raça mais comum entre os recetores é o *Cocker Spaniel*, existindo 3 pacientes desta raça (FR= 18%), seguindo-se a raça Caniche com 2 elementos (FR= 12%). Os restantes 12 (FR= 70%) pacientes são de raças diferentes, representadas por um animal cada.

Em relação à idade a média é de 7,8 anos em que o animal mais novo tem 5 meses (0,4 anos) e o mais velho 14 anos.

Quanto ao sexo, 10 dos pacientes eram fêmeas (FR= 59%), enquanto que os restantes 7 eram machos (FR= 41%).

A causa mais comum para transfusão é AHIM, sendo que 4 (FR= 24%) pacientes receberam uma transfusão sanguínea por essa razão, 3 pacientes (FR=18%) possuíam trombocitopénia imuno-mediada (TID), 2 receberam transfusão devido a CID (FR= 12%).e os restantes 8 (FR= 47%) devido a outras causas.

Gráfico 6. Distribuição das causas de transfusão entre os recetores.



Em relação a tipo sanguíneo, feita a sua classificação através da tira imunocromatográfica da Alvedia ® 12 animais são DEA 1 positivos (FR=71%) e 5 DEA 1 negativos (FR= 29%).

Considerando apenas 12 animais DEA 1 positivos, 4 deles (FR= 33%) tiveram classificação de fraco na expressão antigénica através da tira imunocromatográfica da Alvedia ®, 6 (FR= 50%) tiveram uma expressão normal e 2 uma expressão forte(FR= 17%).

Relativamente ao MFI, o valor mínimo 34 e o máximo 1176, também nos animais DEA 1 positivos. Os resultados foram os seguintes relativamente à classificação correspondente: 2 animais com expressão antigénica fraca (FR= 17%), 4 na categoria normal (FR=33%) e 4 com expressão forte (FR=33%) em 3 animais os resultados não se encontravam disponíveis (FR= 25%).Em 3 animais (FR= 18%), o MFI foi de zero, sendo estes considerados DEA 1 negativos.

Tabela 9. Tabela com informação dos animais que participaram no estudo e receberam transfusões sanguíneas no SIAMU.

Nome	Raça	Idade	Sexo	Causa	DEA 1 Alvedia®	Cat. ¹	MFI	Cat. ²
ADJY	Yorkshire	7	F	AHIM	DEA1+	Normal	1176	Forte
ADJY 2	Yorhshire	7	F	AHIM	DEA1+	Normal	554	Forte
ALCANE	Pastor Alemão	7	M	Hemoabdomen	DEA1-	-	0	0
ANGELE	Dobermann	7	F	AHIM	DEA1+	Fraco	71	Fraco
CHIPIE	Cairn terrier	12	F	Hemagiosarcoma	DEA1+	Normal	287	Normal
DONA	Cocker	4	F	AHIM	DEA1+	Forte		
FERIA	Boxer	2	F	Hemotórax	DEA1-	-	0	0
KRANT'S	American Staffordshire Terrier	1	M	CID	DEA1-	-	0	0
LILLOU	Akita inu	nd	F	Metrorragia	DEA1+	Fraco	173	Normal
MOLLY	Cocker	5m	F	Intoxicação com rodenticida	DEA 1+	Normal	225	Normal
POURQUI	Pastor Belga	14	F	Úlcera no estômago	DEA1+	Fraco	196	Normal
SACHA	Samoiedo	11	M	Carcinoma hepático	DEA1+	Normal	nd	nd
TOSCA	Pastor-de-beauce	10	F	CID	DEA1+	-	639	Forte
ULYS	Cocker	9	M	Trombocitopenia imuno-mediada	DEA1-	-	77	Fraco
ULYSSE C	Caniche	9	M	Trombocitopenia imuno-mediada	DEA1+	Normal	415	Forte
ULYSSE L	Labrador	9	M	Trombocitopenia imuno-mediada	DEA1-	-	34	Muito fraco
VOLTAIRE	Pointer	8	M	AHIM	DEA1+	Fraco	57	Fraco
YERRINE	Caniche	15	F	Massa esplénica	DEA1+	Normal	162	Normal

Legenda: nd- não disponível; M- macho; F-fêmea; AHIM- anemia hemolítica imunomediadas; CID- coagulopatia intravascular disseminada; DEA- *Dog erythrocyte antigen*; Cat¹ é referente à classificação da expressão antigénica através da tira imunocromatográfica e a Cat² alusiva à classificação da expressão antigénica através da citometria de fluxo, com o resultado em MFI.

3.2.1. Adjy

Foram retiradas amostras sanguíneas desta paciente de 3,3 kg que tinha AHIM, que revelaram que antes da primeira transfusão, o tipo sanguíneo, segundo a tira imunocromatográfica, era DEA 1 positivo normal e possuía um MFI de 1173, sendo considerada uma expressão antigénica forte.

Na primeira transfusão a 25/09/12, recebeu 60 ml do dador Gratouille, DEA 1 positivo forte pela classificação através da tira e com um MFI de 356 (Forte).

Passadas 24 a 48 horas, o MFI era de 674 (forte).

A 27/09/12, recebeu uma segunda transfusão, 80 ml do mesmo dador, Gratouille.

Após, 24 a 48 horas da segunda transfusão obteve-se um MFI de 665.

A 28/09/12 foi efetuada uma terceira transfusão, de 120 ml, do dador Denwen, com o tipo sanguíneo DEA 1 positivo, com a classificação de forte tanto pela tira como também pela citometria de fluxo (MFI= 326).

No controlo de 1-2 meses o resultado do MFI foi 554 (forte).

Poucos dias após o controlo, o estado geral do animal piorou e necessitou de uma quarta transfusão, a 20/10/12, em que foram transfundidos 80 ml, do dador Flint, DEA1 negativo, com MFI de 0. A classificação através da tira imunocromatográfica indicava um tipo sanguíneo DEA 1 normal enquanto que o MFI indicava uma expressão antigénica forte (MFI=554).

Foi efetuado um controlo 24 a 48 após a quarta transfusão e obteve-se um MFI de 427(forte). A paciente morreu um mês depois do último controlo.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 6.

3.2.2. Alcane

Canídeo de 35 kg com hemoabdómen, de tipo sanguíneo DEA 1 negativo, determinado pela tira imunocromatográfica e confirmado pela citometria de fluxo com um MFI de 0. Recebeu uma transfusão a 03/12/12, do dador Fetia que é DEA 1negativo, com um MFI de 0.

Após 24-48 horas o resultado do MFI era de 0.

Tanto no controlo de 1-2 meses como no de 4-6meses, o resultado do MFI era de 0.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 7.

3.2.3. Angelle

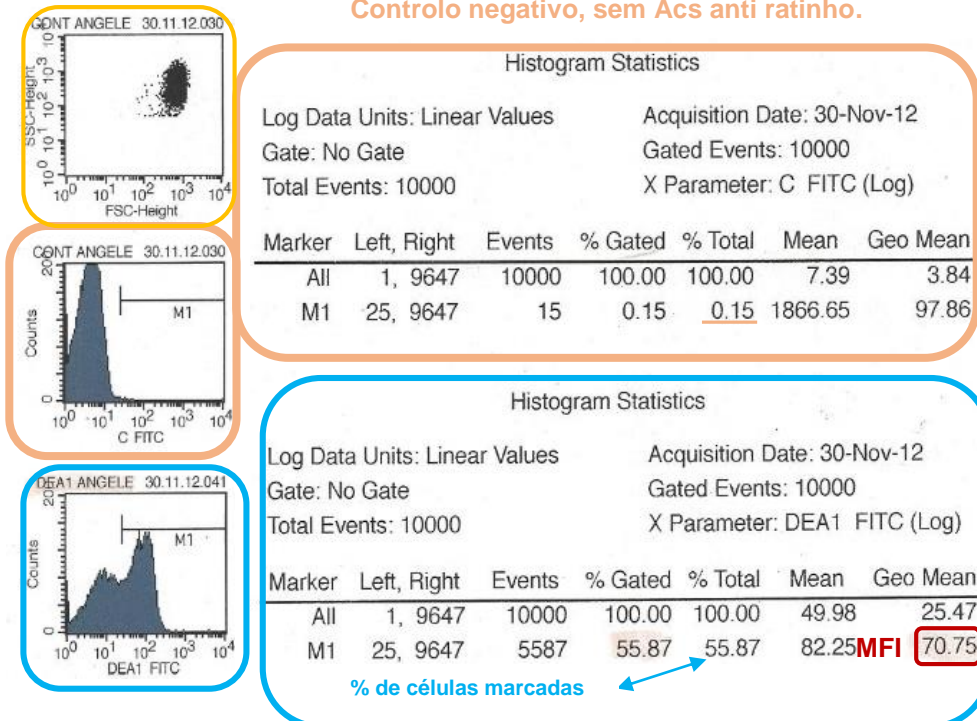
Paciente de 38,9 kg com AHIM, de tipo sanguíneo DEA 1 positivo fraco, tanto através da tira como pela citometria de fluxo (MFI=71).

Recebeu 450ml de sangue total a 28/11/12, do dador Gamelle, que é DEA 1 positivo forte, tanto pela tira como também através da citometria de fluxo (MFI=495).

Figura 13. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Angelle à admissão.

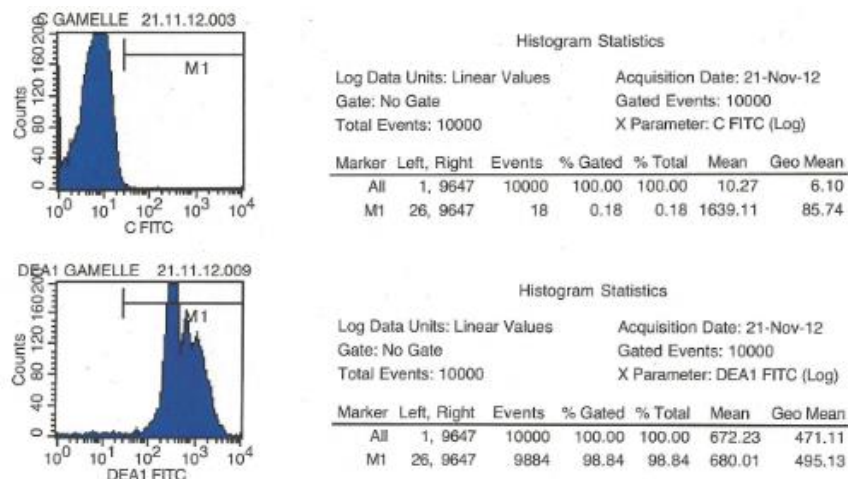
Citograma

Controlo negativo, sem Acs anti ratinho.



Legenda: No controlo negativo os anticorpos anti ratinho são substituídos por PBS. O valor, % Total está entre 0% e 1%, 0,15%, não sendo um número significativo para considerar a média geométrica (MFI), uma vez que apenas 0,15% células se encontram dentro da janela de ajuste (M1) própria para analisar a população de células em estudo (eritrócitos DEA 1 positivos) significando que 0% de células marcadas (eritrócitos DEA 1 positivo) passaram à frente do laser do citómetro. No controlo positivo é representada a média da fluorescência emitida (em logaritmo) e o MFI é a média geométrica (Geo Mean) e não apenas a média, uma vez que os resultados são em logaritmo, sendo mais correto avaliar a média da fluorescência desta maneira. Mais uma vez, o valor % Total corresponde à % de células marcadas que se encontram dentro do gate M1.

Figura 14. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Gamelle.



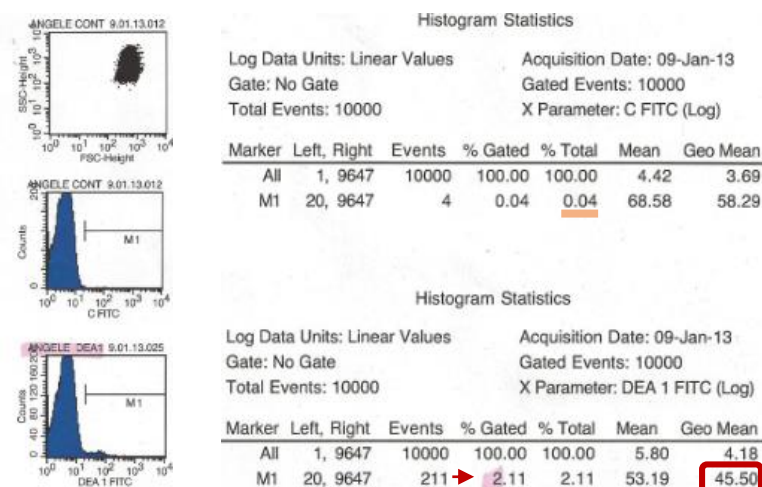
No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 78 (fraco).

Passado 1 a 2 meses o MFI era 0, sugerindo que o animal era DEA negativo.

No controlo dos 4-6 meses o resultado do MFI era de 0.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 8.

Figura 15. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Angelle no controlo dos 1-2 meses.



Legenda: O resultado da média geométrica foi 45,5, mas como apenas 2,1% das células se encontram marcadas, considera-se o MFI de 0, classificando este animal como DEA 1 negativo.

3.2.4. Chipie

Animal de 10 kg com hemangiosarcoma, tipo sanguíneo DEA 1 positivo com a classificação de normal tanto pela tira da Alvedia® como pelo MFI (MFI=287). Recebeu uma transfusão a 12/11/12, do dador Gratouille, que é DEA 1 positivo forte, tanto pela tira como também através da citometria de fluxo (MFI=356).

No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 302 (forte).

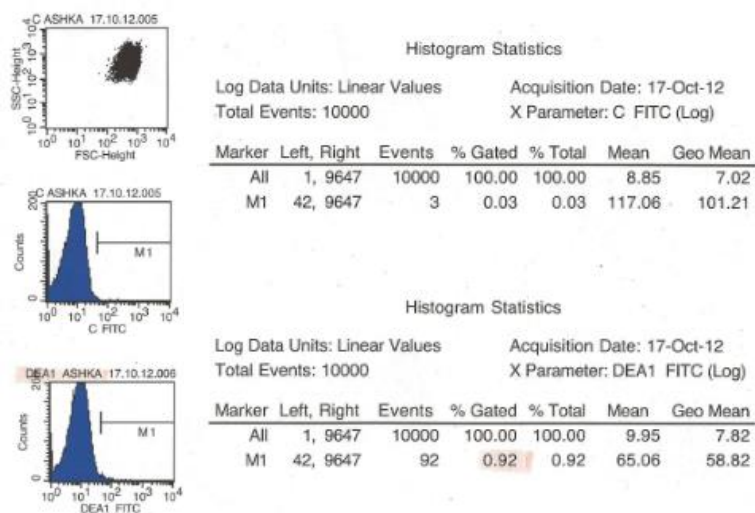
O paciente morreu poucos dias após a transfusão.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 9.

3.2.5. Dona

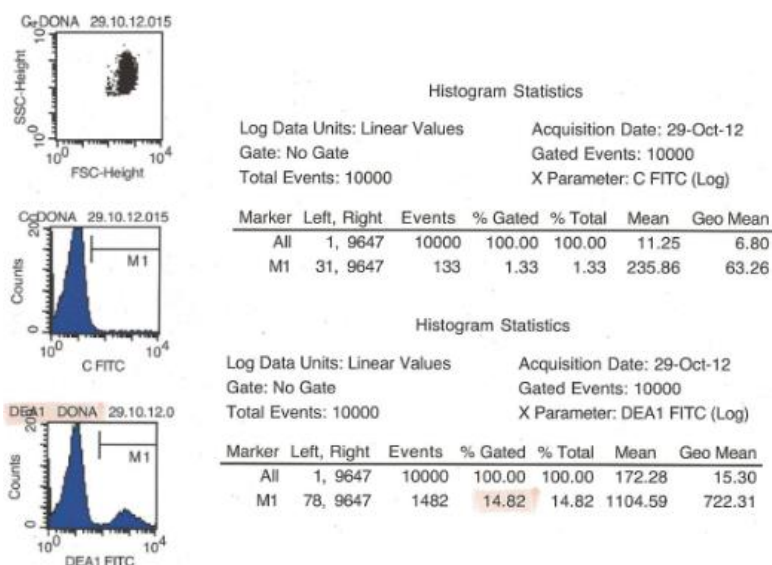
Foram retiradas amostras sanguíneas do canídeo de 16,9 kg que tinha AHIM, revelando que antes da primeira transfusão, o tipo sanguíneo, segundo a tira imunocromatográfica, era DEA 1 positivo forte. A 16/10/12, recebeu uma transfusão de 250 ml, do dador Ashka, DEA 1 negativo.

Figura 16. Citograma, histogramas e respetiva estatística do dador Ashka.



Passadas 24 a 48 horas o MFI era de 722 (forte).

Figura 17. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Dona, 24 a 48 horas após a primeira transfusão com o dador Ashka.

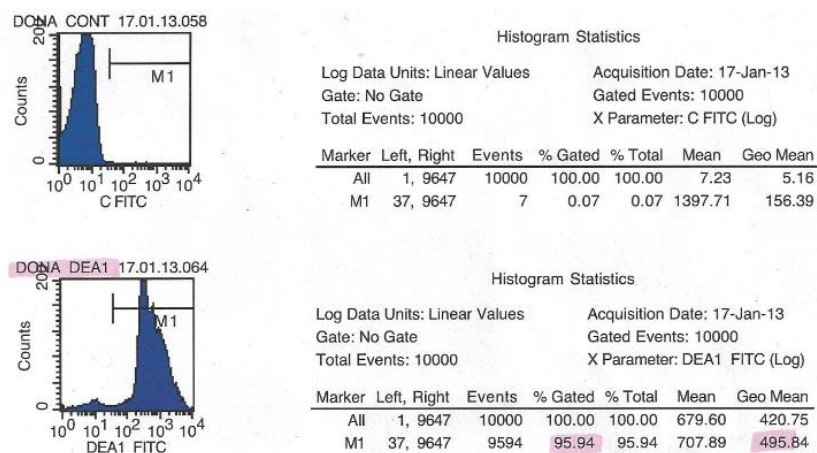


No dia 17/10/12, um dia depois da primeira transfusão, recebeu uma segunda transfusão, de 250 ml do dador Djenka DEA 1 negativo.

No controlo de 1-2 meses o MFI era de 495 (forte).

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 10.

Figura 18. Citograma, histogramas e respetiva estatística do paciente Dona, 1 a 2 meses após a última transfusão.



3.2.6. Feria

Canídeo de 32 kg com hemotórax, de tipo sanguíneo DEA 1 negativo, determinado pela tira imunocromatográfica e confirmado pela citometria de fluxo com um MFI de 0.

Recebeu uma transfusão a 09/12/12, do dador Eddy que é DEA 1 negativo, com um MFI de 0.

Figura 20. Citograma da paciente Feria à admissão.

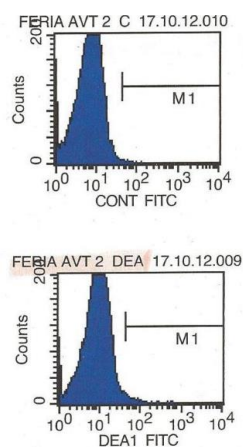
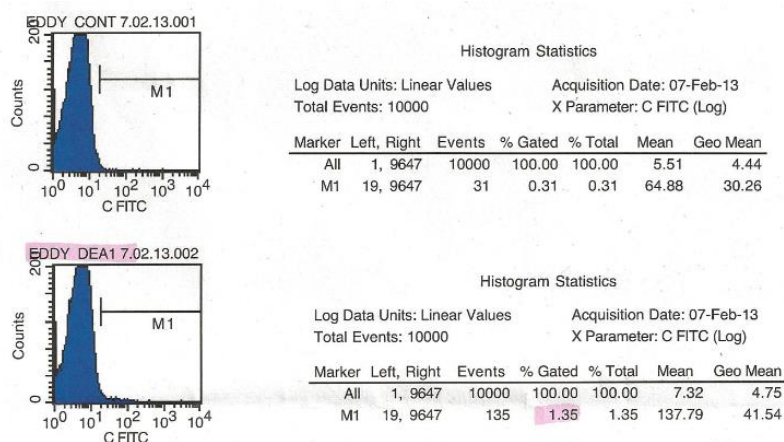
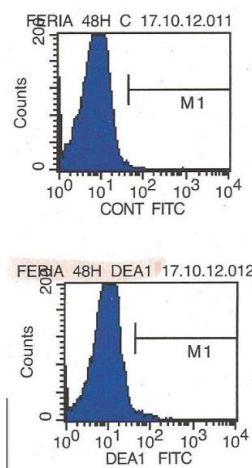


Figura 19. Histogramas e respectiva estatística do dador Eddy.



Após 24-48 horas o resultado do MFI era de 0.

Figura 21. Citograma da paciente Feria 24 a 48 horas pós- transfusão.

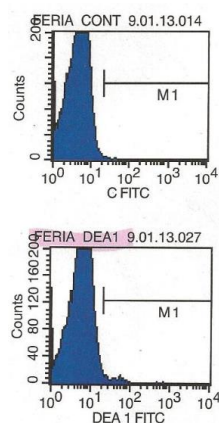


No controlo de 1-2 meses o MFI era de 0.

No controlo de 4-6meses, o resultado do MFI era de 0.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 11.

Figura 22. Citograma da paciente Feria 1 a 2 meses pós- transfusão.



3.2.7. Krants

Paciente de 19,5 kg com CID, de tipo sanguíneo DEA 1 negativo, determinado pela tira imunocromatográfica e confirmado pela citometria de fluxo com um MFI de 0.

Após 24-48 horas o MFI era de 0.

No controlo de 1-2 meses o MFI era de 0.

No controlo de 4-6meses, o resultado do MFI era de 0.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 12.

3.2.8. Lilou

Animal de 20 kg com uma metrorragia, tipo sanguíneo DEA 1 positivo com a classificação de fraco pela tira da Alvedia® e normal pela citometria de fluxo, com um MFI de 173. Recebeu uma transfusão a 08/11/12, do dador Lulu, que é DEA 1 positivo muito fraco, pela tira e forte através da citometria de fluxo (MFI=397).

No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 232 (normal).

O paciente morreu poucos dias após a transfusão.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 13.

3.2.9. Molly

Canídeo de 4,4 kg, intoxicado com rodenticida tipo sanguíneo DEA 1 positivo com a classificação de normal tanto pela tira da Alvedia® como pelo MFI (MFI=225).

Recebeu uma transfusão de 80 ml a 08/02/13, do dador Django, que é DEA 1 positivo normal, tanto pela tira como também através da citometria de fluxo (MFI=214).

No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 214 (normal)

No controlo de 1-2 meses o MFI era de 225 (normal).

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 14.

3.2.10. Pourquoi

Animal de 29,6 kg tinha uma úlcera no estômago, tipo sanguíneo DEA 1 positivo com a classificação de fraco pela tira da Alvedia® e normal pela citometria de fluxo, com um MFI de 196.

Recebeu uma transfusão a 16/01/13, do dador Arko, que é DEA 1 normal, pela tira e forte através da citometria de fluxo (MFI=338).

No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 347 (forte).

Passados dois dias da primeira transfusão realizou-se a segunda, onde o paciente, recebeu 250 ml do dador Euskadi que é DEA 1 negativo com MFI de 0.

Passados 24-48 horas da segunda transfusão o MFI era de 408, sendo considerado forte.

O paciente morreu poucos dias após a transfusão.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 15.

3.2.11. Sacha

Foram retiradas amostras sanguíneas desta paciente de 28,7 kg que possuía um carcinoma hepático, que revelaram que anteriormente à primeira transfusão, o tipo sanguíneo, segundo a tira imunocromatográfica, era DEA 1 positivo normal.

A 15/12/12, recebeu três transfusões sanguíneas: do dador Dali que é DEA 1 positivo forte tanto pela tira como através da citometria de fluxo (MFI=753) recebeu 150 ml, do dador Suerte que é DEA 1 positivo forte através da tira e MFI (MFI=568) recebeu 250 ml e mais 250 ml do dador Flip que é DEA 1 positivo forte tanto pela citometria de fluxo (MFI=690) como pela tira imunocromatográfica.

Após 24 a 48 horas das primeiras três transfusões o MFI era de 367 (forte).

A 16/12/12, recebeu uma quarta transfusão, 250 ml do dador Baila que é DEA 1 positivo normal pela tira da Alvedia® e forte através da citometria de fluxo, com um MFI de 445.

No controlo de 24 a 48 horas da quarta transfusão obteve-se um MFI de 245 (normal).

A 18/12/12 foi efetuada uma quinta transfusão, de 250ml do dador Enjoy, com o tipo sanguíneo DEA 1 positivo e um MFI de 228 (normal).

Depois de passadas 24 a 48 horas da quinta transfusão obteve-se um MFI de 73 (fraco).

No controlo de 1-2 meses o resultado do MFI foi 617 (forte).

No controlo dos 4-6 meses o MFI era forte, de 628.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 16.

3.2.12. Tosca

Animal de 40 kg com CID, tipo sanguíneo DEA 1 positivo forte, classificado pela citometria de fluxo, com um MFI de 639.

Recebeu duas transfusões a 16/10/12, 250 ml do dador Denwen que é DEA 1 positivo forte, tanto pela tira como também através da citometria de fluxo (MFI=326) e 250 ml do dador Foldingue que é DEA 1 positivo forte por ambos os métodos de tipificação, com um MFI de 609.

No controlo de 24- 48 horas o MFI era de 747 (forte).

O paciente morreu poucos dias após a transfusão.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 17.

3.2.13. Ulys

Amostras sanguíneas colhidas do canídeo de 12,9 kg com trombocitopénia imuno-mediada, que revelaram que antes da primeira transfusão, o tipo sanguíneo, segundo a tira imunocromatográfica, era DEA 1 negativo com o MFI de 0.

A 21/10/12, recebeu uma transfusão de 250 ml.

Passadas 24 a 48 horas, o resultado MFI era de 89 (fraco).

No dia 24/10/12, recebeu uma segunda transfusão, de 250 ml do dador Flint DEA 1 negativo.

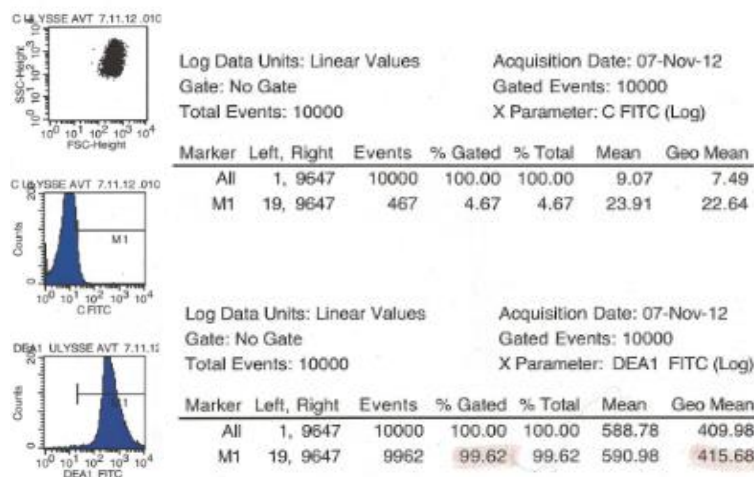
O paciente morreu semanas após a última transfusão.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 18.

3.2.14. Ulysse C

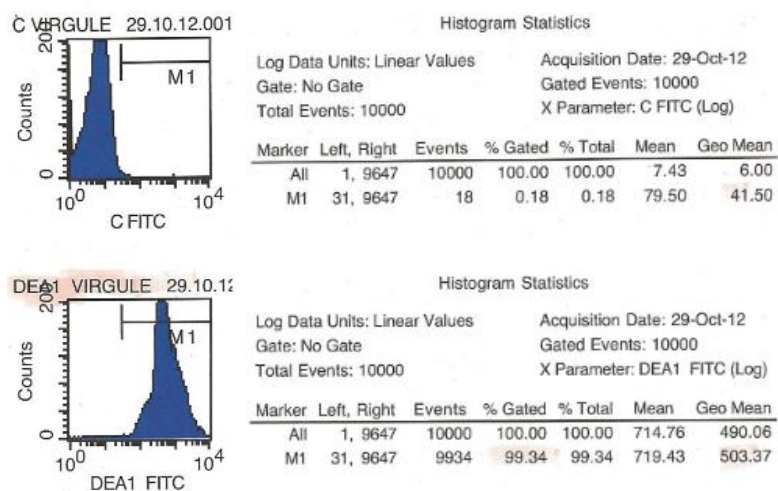
Canídeo de 3,8 kg com trombocitopénia imuno-mediada, com tipo sanguíneo DEA 1 positivo normal através da tira e forte pelo MFI (MFI=415).

Figura 23. Citograma, histogramas e respectiva estatística do paciente Ulysse C. à admissão.



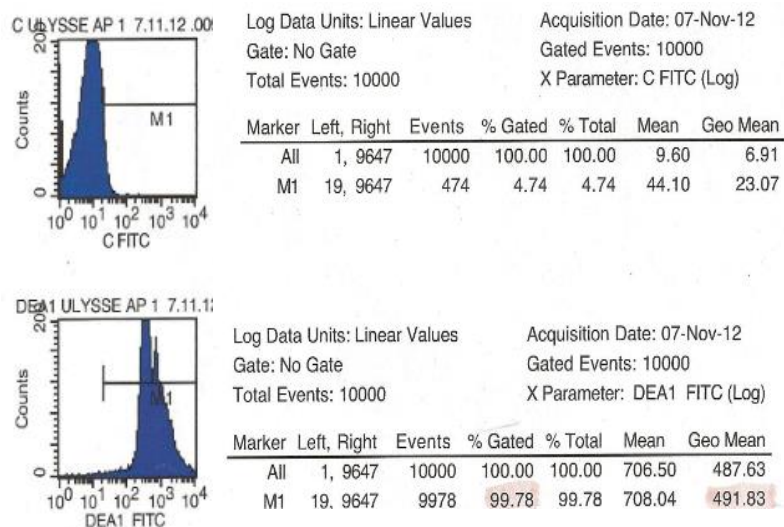
A 30/10/12, recebeu uma transfusão sanguínea do dador Virgule que é DEA 1 positivo forte tanto pela tira como através da citometria de fluxo (MFI=503).

Figura 24. Histogramas e respectiva estatística do dador Virgule.



Após 24 a 48 horas o MFI era de 491 (forte).

Figura 25. Histogramas e respectiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 24-48 horas.



A 04/11/12, recebeu uma segunda transfusão, 120 ml do dador Eiko, DEA 1 positivo fraco pela tira da Alvedia® e pela citometria de fluxo, com um MFI de 60.

No controlo de 24 a 48 horas da segunda transfusão obteve-se um MFI de 93 (fraco).

A 06/11/12 foi efetuada uma terceira transfusão, de 130ml, novamente do dador Eiko.

Figura 26. Citograma, histogramas e respectiva estatística do dador Eiko.

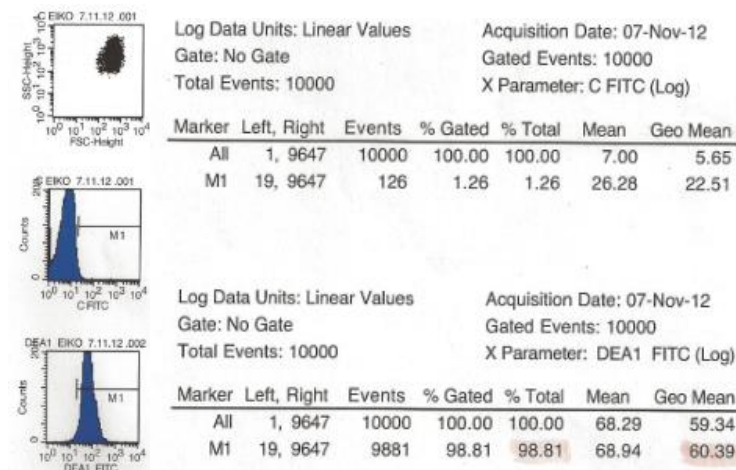
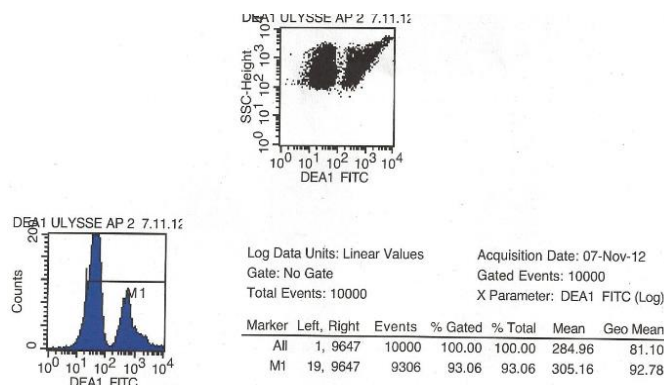


Figura 27. Citograma, histogramas e respectiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 24-48 horas após a segunda transfusão.



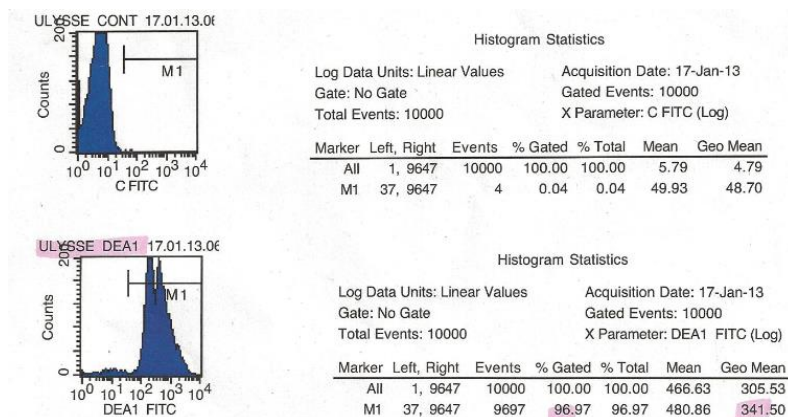
Depois de passadas 24 a 48 horas da terceira transfusão obteve-se um MFI de 65 (fraco).

No controlo de 1-2 meses o resultado do MFI foi 342 (forte).

No controlo dos 4-6 meses o MFI era forte, de 369.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 19.

Figura 28. Histogramas e respectiva estatística do paciente Ulysse C no controlo de 1- 2 meses.



3.2.15. Ulysse L

Paciente de 19,5 kg com trombocitopénia imuno-mediada, de tipo sanguíneo DEA 1 negativo segundo a tira imunocromatográfica e DEA positivo muito fraco através da citometria de fluxo, com um MFI de 34.

Recebeu uma transfusão a 14/11/12, de 450 ml do dador Croc dur, DEA 1 negativo, com um MFI de 0.

Após 24-48 horas o MFI era de 33, muito fraco

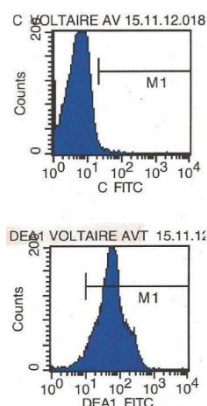
No controlo de 1-2 meses o MFI era de 32, ou seja, muito fraco.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 20.

3.2.16. Voltaire

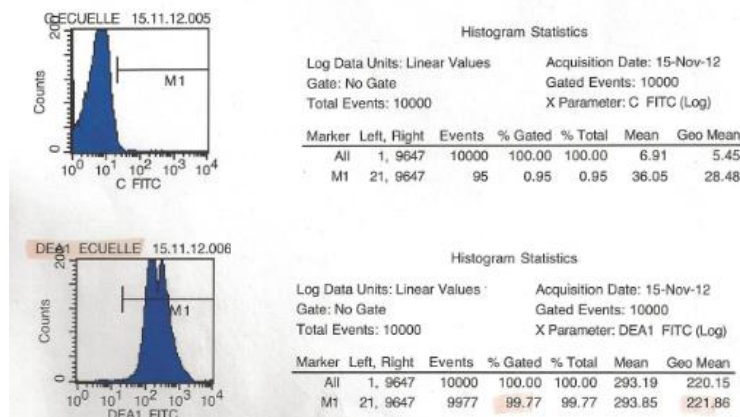
Paciente de 31 kg com diagnóstico de AHIM, com tipo sanguíneo DEA 1 positivo fraco tanto pela tira como pelo MFI (MFI=57).

Figura 29. Histogramas do paciente Voltaire à admissão.



A 10/11/12, recebeu uma transfusão sanguínea, 450 ml do dador Ecuelle, DEA 1 muito fraco pela tira e normal através da citometria de fluxo (MFI=222).

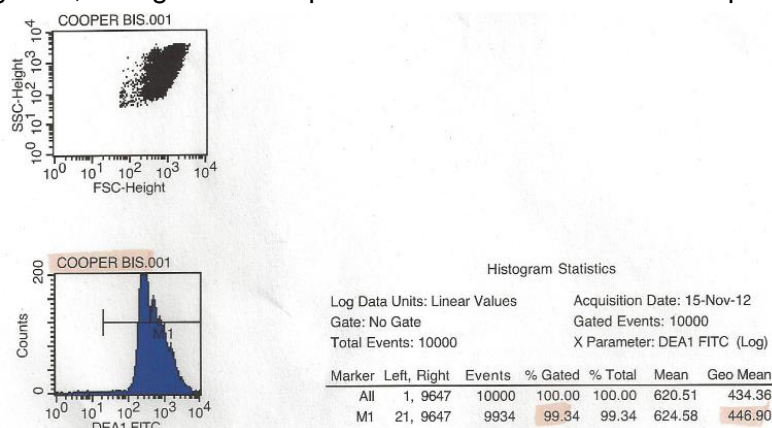
Figura 30. Histogramas e respectiva estatística do dador Ecuelle.



Após 24 a 48 horas o resultado MFI era de 71(fraco).

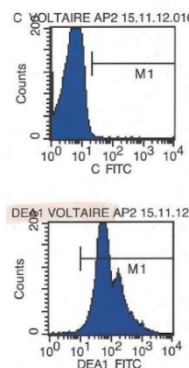
A 11/11/12, recebeu uma segunda transfusão, 380 ml do dador Cooper, DEA 1 positivo forte pela tira da Alvedia® e pela citometria de fluxo, com um MFI de 447.

Figura 31. Citograma, histograma e respectiva estatística do dador Cooper.



No controlo de 24 a 48 horas da segunda transfusão transfusão obteve-se um MFI de 78 (fraco).

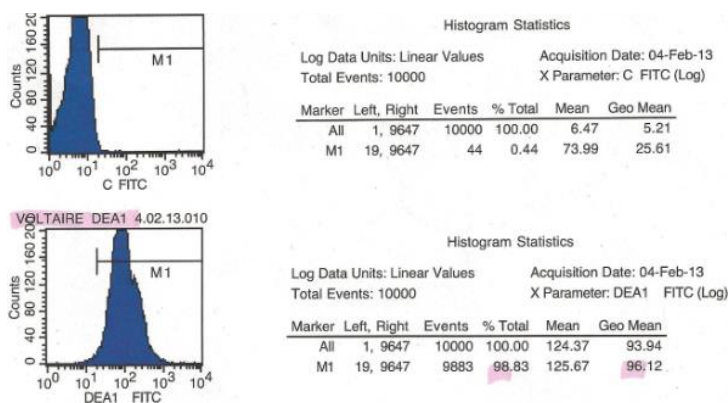
Figura 32. Histogramas do paciente Voltaire, 24 a 48 horas após a segunda transfusão.



No controlo de 1-2 meses o resultado do MFI foi 96 (fraco).

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 21.

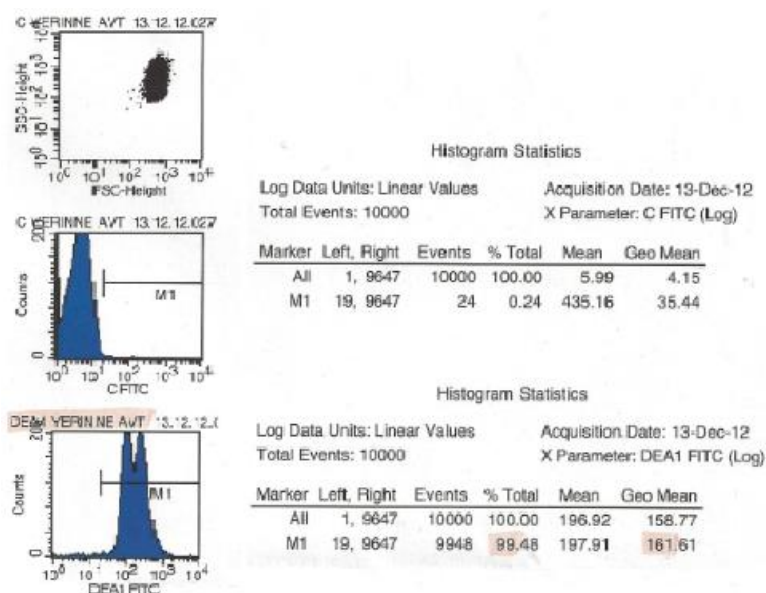
Figura 33. Histogramas e respectiva estatística do paciente Voltaire no controlo de 1 a 2 meses.



3.2.17. Yerrine

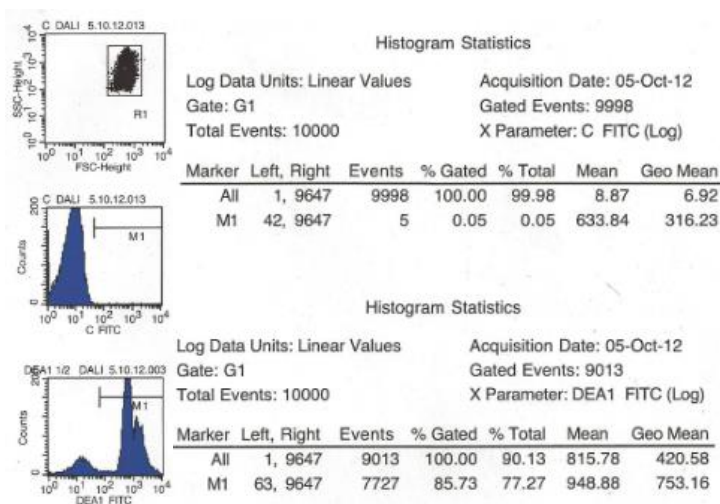
Paciente de 4,7 kg possuía uma massa esplênica, de tipo sanguíneo DEA 1 positivo normal segundo a tira imunocromatográfica e a citometria de fluxo, com um MFI de 162.

Figura 34. Citograma, histogramas e respectiva estatística do paciente Yerrine à admissão.



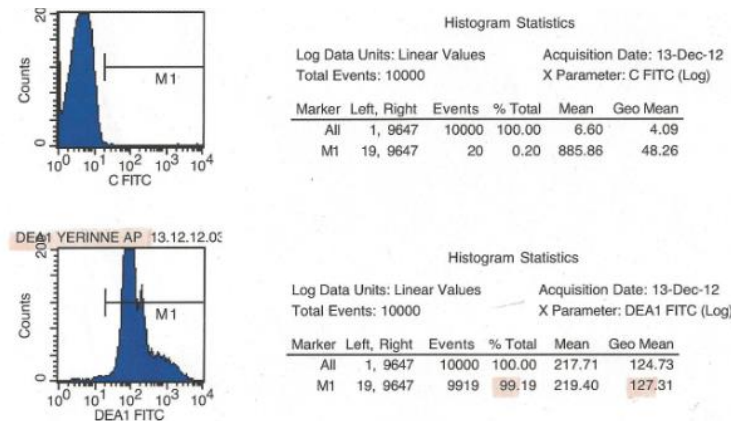
Recebeu uma transfusão a 11/12/12, de 250 ml do dador Dali, DEA 1 positivo forte tanto pelo MFI (MFI=753) como pela tira.

Figura 35. Citograma, histogramas e respectiva estatística do dador Dali.



Após 24-48 horas o MFI era de 127, normal.

Figura 36. Citograma, histogramas e respectiva estatística do paciente Yerrine 24 a 48 horas após a transfusão.

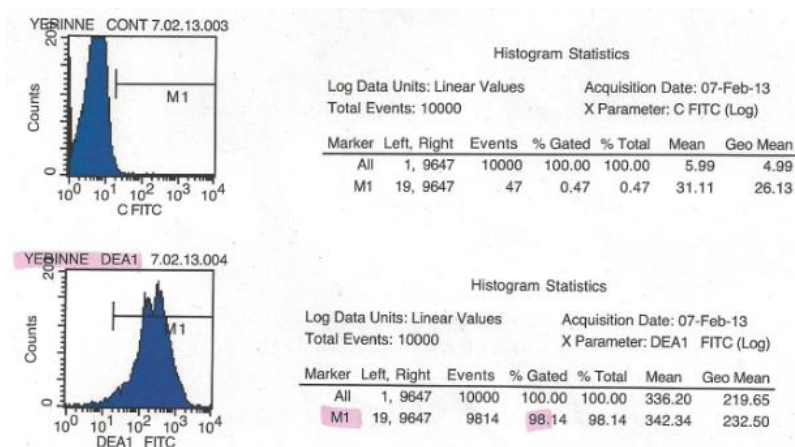


No controlo de 1-2 meses o MFI era de 232, ou seja, normal.

Passados 4 a 6 meses o MFI continuava normal, com um valor de 249.

A evolução do hemograma deste paciente pode ser consultada no anexo 22.

Figura 37. Citograma, histogramas e respectiva estatística do paciente Yerrine no controlo de 1-2 meses.



4. Discussão dos resultados e conclusão

A prática comum de transfusões sanguíneas em Medicina Veterinária é relativamente recente, pelo que é natural que tanto, as técnicas de transfusão, como as de tipificação sanguínea se desenvolvam e sejam aperfeiçoadas. Este melhoramento deve-se ao facto de haver um maior entendimento acerca das diferenças entre os grupos sanguíneos e perigos de reações transfusionais. De momento, a prevenção dos riscos, na sua maioria, envolve a seleção cuidadosa do dador e do produto sanguíneo a administrar, assim como, a adoção de boas

práticas de colheita, amostragem, manuseamento e administração. Apesar dos riscos associados, quando corretamente realizadas, as transfusões de sangue e derivados sanguíneos pode desempenhar um papel vital no tratamento de vários pacientes que são admitidos nas urgências e cuidados intensivos.

A citometria de fluxo vem proporcionar uma grande ajuda, na medida em que é uma técnica indispensável para o estudo de populações de células, para quantificar o número e a frequência das populações de interesse e neste caso, estudar quantitativamente a expressão antigénica de um tipo sanguíneo.

Tendo em conta os vários testes de tipificação e respetivas limitações concluiu-se que a especificidade é, a característica mais importante no que respeita à tipificação do recetor, uma vez que, um teste com poucos ou nenhuns resultados falsos positivos, tal como a tira imunocromatográfica e o teste em coluna de gel, que irão prevenir a transfusão de sangue DEA 1.1 positivo a pacientes DEA 1.1 negativos. A sensibilidade é, no entanto, a característica mais importante na tipificação de dadores, porque, um teste com poucos ou nenhuns resultados falsos negativos, tal como o teste em coluna de gel ou a aglutinação em cartão, irá prevenir a má identificação do tipo sanguíneo, tal como identificar uma amostra DEA 1.1 positiva como DEA 1,1 negativo.

Ao analisar os resultados dos dadores (N=56) do banco de sangue do SIAMU obtidos pela tira da Alvedia® e a citometria houve 100% de concordância na tipificação sanguínea.

A citometria providenciou resultados viáveis na classificação da expressão antigénica. Estes, são demonstrados facilmente pelos histogramas e pela respetiva estatística, nomeadamente o MFI e pela percentagem de células marcadas dentro do gate M1.

Durante o seguimento dos pacientes que receberam transfusão e ao comparar os histogramas e MFI antes e após a transfusão, analisou-se que é possível distinguir as células transfundidas sem alteração da antigenicidade dos eritrócitos do recetor. As mesmas já não são identificáveis no controlo dos 2 meses.

Ao comparar os resultados obtidos pela tira e pela citometria de fluxo nos animais que receberam transfusão não se obteve total consonância de resultados no que toca à tipificação do grupo sanguíneo. Dos 17 animais, temos informação pré-transfusional pelos dois métodos em 15. Existe concordância em 13 animais (FR= 87%). Os dois animais, em que a tipificação resultou em grupos sanguíneos diferentes padeciam de trombocitopenia imuno-mediada e ambos foram classificados DEA 1 negativo pela tira e DEA 1 positivo fraco e muito fraco pela citometria de fluxo. Tendo em conta que o estudo reúne uma amostra pequena e heterogénia (atendendo às patologias) de indivíduos não se consegue inferir se a trombocitopenia imuno-mediada interfere com os resultados. Tal facto também se pode dever à margem de erro (aproximadamente de 30%

de acordo com o fabricante e com ensaios preliminares) induzida pela escala logarítmica utilizada para o cálculo do MFI (média geométrica) ou pelo carácter subjetivo da leitura da tira da Alvedia®. Atendendo à viabilidade da tira imunocromatográfica, apesar de haver total concordância de resultados na tipificação ao comparar com a citometria de fluxo, o mesmo não ocorre na classificação da intensidade da expressão antigénica. Em 7 animais (FR=23%), a classificação pela tira não era concordante com o MFI. Esta diferença pode dever-se ao carácter subjetivo da leitura da intensidade da linha na tira da Alvedia®

Examinando ainda a viabilidade da tira imunocromatográfica há que ter em consideração os resultados das classificações obtidas pelos alunos. Em 31 dadores DEA 1 positivos do banco de sangue houve concordância em 14 casos (FR=45%), havendo maior concordância na classificação de fraco (FR=46%). Houve apenas um caso em que, todos os 5 alunos concordaram que era “forte”. Um animal teve, pelos diferentes alunos, a classificação de fraco, normal e forte. Pode-se então afirmar que os resultados sejam bastante fiáveis na classificação do tipo sanguíneo em DEA 1 positivo e DEA 1 negativo. Todavia há alguma discordância na classificação da intensidade da linha, mesmo tendo sido retirada a classificação de muito fraco. É importante referir que a classificação através da tira seja feita por um operador altamente treinado, mas de qualquer maneira, sempre que possível, a classificação da expressão antigénica, deve ser obtida através da citometria de fluxo.

Tendo em conta a eficiência da citometria de fluxo na classificação da expressão antigénica, existem 3 casos de 3 dos dadores utilizados neste projeto que demonstram, de maneira eficiente tal acontecimento: *Gamelle* (DEA 1 positivo forte com MFI= 495), *Eiko* (DEA 1 positivo fraco com MFI =60) e *Eddy* (DEA 1 negativo com MFI=0). No primeiro, o pico de fluorescência, é menos definido que em outros dadores, o que significa que existe uma população heterogénea de antigénio. No entanto este facto não interferiu com a classificação final obtida uma vez que todos os seus eritrócitos são DEA 1 positivo, sendo o resultado do MFI 495. No dador Eiko, o pico é bem definido, embora o MFI DEA 1 positivo seja menor que em outros dadores. No caso do dador Eddy não se obteve um pico em M1 característico da presença do antigénio DEA 1, uma vez que Eddy é um dador DEA 1 negativo. Na estatística relativa ao histograma do dador Eddy, é possível notar que a percentagem de células marcadas é de 1,35%, o que é considerado um resultado inválido, apesar da sua média geométrica ter um valor de 41,54. Este fato pode ser explicado através da hibridação não específica do anticorpo secundário, emitindo fluorescência não específica. Logo o dador Eddy é considerado um DEA 1 negativo com um MFI=0, uma vez que não possui antigénios DEA 1 na superfície dos seus eritrócitos.

Após vários casos de animais transfundidos foi demonstrado o papel da citometria de fluxo como monitorização dos eritrócitos transfundidos. Como foi dito anteriormente é possível observar as

populações de dadores e recetores. No caso da paciente *Dona*, embora não se tenha o resultado do MFI à admissão, este foi considerado forte pela tira da Alvedia® citometria de fluxo e recebeu sangue de um dador DEA 1 negativo. No histograma do controlo das 24 a 48 horas nota-se claramente dois picos de fluorescência distintos, correspondentes a duas populações diferenciadas de eritrócitos, em que o pico maior corresponde à fluorescência emitida pelos eritrócitos do dador *Ashka* e o menor aos eritrócitos da paciente *Dona*. Já no controlo dos 2 meses, também se distinguia duas populações distintas, e já grandemente destacado o pico da paciente *Dona*, que continua com o MFI forte (MFI= 495), embora o pico do dador esteja bastante diminuído. O paciente *Ulysse C*, é DEA 1 forte, com um MFI DE 415 à admissão, primeiramente recebe uma transfusão de um dador também com um MFI alto (MFI=503, forte), e devido ao facto de ambos serem DEA 1 positivos fortes, com MFIs semelhantes, não se conseguem distinguir as duas populações no controlo das 24 a 48 horas (MFI=491). Porém, *Ulysse C* recebe, uma segunda transfusão, desta vez de um dador DEA positivo fraco (MFI=60) e no controlo das 24 a 48 horas já é possível distinguir as duas populações de eritrócitos representadas por dois picos de fluorescência diferentes, sendo o mais à direita correspondente ao dador e o da esquerda do paciente que neste ensaio tem um MFI mais baixo, de 93 (fraco), bastante influenciado pela expressão antigénica do dador. No controlo dos 2 meses já só é possível observar, no histograma, o pico referente ao paciente e o seu MFI voltou a ser forte, com um valor de 341.

No caso do paciente *Voltaire*, este era DEA 1 positivo fraco, com um MFI de 57 e recebeu duas transfusões, em que a segunda foi do dador *Cooper*, DEA 1 forte, com um MFI de 447. No controlo das 24 a 48h mais uma vez, é possível distinguir as duas populações de eritrócitos, em que o pico da direita corresponde ao do dador, que também influenciou ligeiramente o MFI do paciente *Voltaire*, que neste controlo subiu de 57 para 78. Tal como nos outros casos, no controlo dos 2 meses já não é possível distinguir a população correspondente ao dador.

Através do seguimento dos pacientes, é interessante notar que quando o paciente e o dador possuem diferentes expressões do antígeno DEA, sendo mais notório quando estes são extremos (DEA 1 forte com DEA 1 muito fraco ou fraco), o recetor irá demonstrar uma população dupla de expressão antigénica indicando que a expressão do antígeno do recetor e dador são conservadas e além disso, o paciente irá recuperar a sua expressão antigénica após o desaparecimento dos eritrócitos transfundidos, o que ocorre, normalmente até aos 2 meses pós-transfusão. Também se chegou à conclusão que a transfusão entre canídeos com diferentes expressões antigénicas não induz o aparecimento de aloanticorpos contra DEA 1.

Embora autores reconheçam a utilidade da citometria de fluxo em identificar e classificar classes de imunoglobulinas na superfície dos eritrócitos (Lucidi et al., 2011; Wilkerson, 2012), até à data só foi efetuado um estudo similar a este projeto, na área da tipificação sanguínea em Medicina

Veterinária. Nesse estudo, da Alvedia®, foi comparado o resultado da tipificação sanguínea pela tira imunocromatográfica com o teste de microtubos em gel e com a citometria de fluxo. Apesar de terem sido obtidos resultados concordantes nos exemplos demonstrados, não são apresentadas quaisquer percentagens dos resultados e informação sobre a população alvo e também só foram analisadas amostras com fraca expressão antigénica, não tendo sido abordadas as outras intensidades de expressão antigénica (Alvedia®, 2012b). Wilkerson (2012) utilizou o citómetro para analisar imunodeficiências, e trombopatias e doenças oncológicas, analisando diferenças em células leucocitárias, uma vez que leucócitos saudáveis emitem fluorescências diferentes daqueles que estão afetados. Já Lucidi *et al.* (2011) realizou um estudo para determinar a presença do antígeno DEA 1.1 na superfície de plaquetas de canídeos, embora os mesmos não tenham sido encontrados. Em medicina humana há um estudo semelhante ao descrito neste trabalho em que se investigou a presença do grupo sanguíneo Rhesus (Rh) (Nelson *et al.*, 1995). Este sistema de tipificação baseia-se na presença do antígeno D, permitindo classificar os indivíduos em Rh positivo ou negativo consoante possuam ou não o antígeno D. Tal como no antígeno DEA 1.1 existem diferentes intensidades de expressões do antígeno D permitindo a classificação D “fraco”. O trabalho sobre o antígeno D do sistema Rh foi comprovado, através da citometria de fluxo, também por outro estudo de Wu *et al.* (2013) em que todas as amostras D fracas provaram ser, através do TAI, D positivas.

Este projeto permitiu retirar conclusões bastante interessantes na área da medicina transfusional e na aplicação da citometria de fluxo. Porém recomenda-se que no futuro estudos deste género sejam mais alargados no tempo, de maneira a conseguir um maior número de indivíduos, porque o seguimento é complicado, uma vez que os proprietários nem sempre voltam para permitir a colheita de amostras e muitos pacientes morrem antes de ser possível fazer o seguimento até aos 6 meses.

Finalmente, conclui-se que a citometria de fluxo é uma grande ajuda para esclarecer a tipificação sanguínea, devendo ser considerado um método de referência nesta área. Pode-se afirmar que o seu uso é quase essencial na criação de um banco de sangue e na classificação de novos dadores, embora, não seja tão importante recorrer a este método em potenciais recetores, uma vez que é mais demorado e dispendioso, sendo mais simples dominar uma técnica de tipificação rápida para estes casos.

III. Bibliografia

Abrams-Ogg, A. & Schneider, A. (2010). Principles of Canine and Feline Blood Collection, Processing, and Storage. In D.J. Weiss & K.J. Wardrop, Schalm's veterinary hematology. (6th ed.). (pp. 731-737). Iowa, Wiley-Blackwell.

Abrams-Ogg, A. & Gibson, G. (2012). Canine transfusion medicine. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.). Eds.), BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. (pp.289-307). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Adamantos, S. (2008). Scientific proceedings: companion animals programme. Transfusion medicine [versão electrónica]. Proceedings of the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen, Amsterdam, Netherlands, 24-26 April, p 62-63. Acedido em Out. 29, 2013, disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/voorjaarsdagen/2008/critical/62.pdf>

Animal blood resources international (2013). Cross-match. Acedido em Nov. 12, 2013. Disponível em: <http://abrint.net/ABRI%20CrossMatch.pdf>

Alvedia® (2012a) Lab Test Technology for blood Typing in cats & dogs: The first Immuno-chromatography technique . Lyon: Alvedia®.

Alvedia® (2012b). Alvedia® Scientific Study, Expression of DEA 1.1 molecules on canine red blood cells: Interpretation of weak DEA 1.1 with Alvedia® Quick Test, DiaMed Gel Test and Flow Cytometer. Acedido em Dez.4, 2012. Disponível em: http://www.Alvedia.com/sites/default/files/pdf/DEA1.1%20presentation_web.pdf

Alvedia® (2013a). Quick test DEA 1.1, User Guide. Acedido em Nov. 20, 2013. Disponível em: <http://www.Alvedia.com/sites/default/files/pdf/USER%27S%20GUIDE%20DOG%20FINAL.pdf>

Alvedia® (2013b). Quick test A+B, User Guide. Acedido em Nov.20, 2013. Disponível em: <http://www.Alvedia.com/sites/default/files/pdf/USER%27S%20GUIDE%20CAT%20FINAL.pdf>

Animal Blood Resources International (2014). Why can you not determine whether a dog has the DEA 3 or DEA 5 blood type? Acedido em Dez.10.2013, disponível em: <http://abrint.net/faq#why-can-you-not-determine-whether-a-dog-has-the-dea-3-or-5-blood-type>

Ferreira, R., Lobo, L., Guimarães, A., Matos, A.J.F. (2008). Transfusões sanguíneas em animais de companhia: reacções transfusionais. Acedido em Nov.10, 2013. Disponível em: <http://www.bsanimal.com/content/publications/articles/Transfusoes%20sanguineas%20em%20animais%201.pdf>

Ferreira, R., Lobo, L., Guimarães, A., Matos, A.J.F. (2008). Transfusões sanguíneas em animais de companhia. Acedido em Nov.10, 2013. Disponível em: <http://www.bsanimal.com/content/publications/articles/Transfusoes%20sanguineas%20em%20animais%201.pdf>

Blais M.C., Berman L, Oakley DA, Giger U. (2007). Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmations. Journal of Veterinary Internal Medicine, 21(2): 281-286.

Blais MC, Rozanski EA, Hale AS, Shaw SP, Cotter SM. (2009). Lack of evidence of pregnancy induced alloantibodies in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, 23(3):462-465.

Blais, S.L., Richardson, D.M., Abrams-Ogg, A.C.G. (2013). Comparison of a gel column blood typing method and a point-of-care cartridge for Dog Erythrocyte Antigen 1.1. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 00(0), 1-4.

Brooks, M.B. (2010). Transfusion of Plasma Products. In D.J. Weiss & K.J. Wardrop, *Schalm's veterinary hematology*. (6th ed.). (pp. 744-750). Iowa, Wiley-Blackwell.

Callan, M.B. (2010). Red Blood Cell Transfusion in the dog and cat. In D.J. Weiss & K.J. Wardrop, *Schalm's veterinary hematology*. (6th ed.). (pp. 738-743). Iowa, Wiley-Blackwell.

Casari, T.M. (2012). Reações transfusionais na clínica de pequenos animais, revisão de literatura. Monografia de conclusão do curso de Medicina Veterinária. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária- Universidade de Brasília.

Cornell University, College of Veterinary Medicine (2014). Direct Coombs' Testing. Acedido em Jan.12. 2014, disponível em: <https://ahdc.vet.cornell.edu/sects/clinpath/test/immun/coombs.cfm>

Cunha, L.F.G., Ferreira, R.M.R.F., Ferreira, A.C.S. (2011). Whole blood transfusion in small animals: indications and effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83(2), 611-617.

Davidow, E.B. (2012a). How to give blood transfusions safely: The type and cross-match. *Proceedings of the 18th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference*. Texas, United States of America, 8-12 September.

Davidow, E.B. (2012b). How to give blood transfusions safely: Transfusions reactions. *Proceedings of the 18th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference*. Texas, United States of America, 8-12 September.

Day, M.J. (2012). Feline blood groups and blood typing. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp.284-288). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Day, M.J. (2012). Immune-mediated haemolytic anaemia. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp.59-66). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Douglas, K.M. (2009). Anemia in feline critical illness. *Proceedings of the 15th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference*. Chicago, United States of America, 9-11 September.

Ferreira, R.R., Gopegui, R.R. & Matos, A.J. (2011). Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(2), 198-201.

Garratty, G., Arndt, P.A. (1999). Applications of flow cytometry to red blood cell immunology. *Communications in clinical cytometry*, 38, 259-267.

Garratty, G. (2004). Autoantibodies induced by blood transfusion. *American Red Cross Blood Services: Transfusion*, 44, 5-9.

Garratty, G. (2010). Advances in red blood cell immunology 1960 to 2009. *American Red Cross Blood Services: Transfusion*, 50, 526-535.

Giger, U., Stieger, K., Palos, H. (2005a). Comparison of various canine blood-typing methods. American Journal of Veterinary Research, 66, 1386-1392.

Giger, U. (2005b). Ensuring blood compatibility: Update on canine typing and crossmatch. Proceedings of the 23rd American College of Veterinary Internal Medicine Conference. Baltimore, United States of America.

Giger, U. (2009c). Are you my type and what to do when incompatible?. Proceedings of the 15th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference. Chicago, United States of America, 9-11 September.

Giger, U., Davidow, B., Hale, A.S., Justine, L. (2009c). Panel on transfusion medicine practice. Proceedings of the 15th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference. Chicago, United States of America, 9-11 September.

Giger, U. (2009d). Peculiarities about feline transfusion medicine. Proceedings of the 15th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference. Chicago, United States of America, 9-11 September.

Giger, U. (2005e). Therapeutic considerations for the bleeding. Proceedings of the 23rd American College of Veterinary Internal Medicine Conference. Baltimore, United States of America.

Graça, R.M.C. (2012). Transfusões de sangue total e concentrado de eritrócitos em cães e gatos: avaliação das indicações, efeitos e consequências. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa.

Green, E.B.R. & Hughes V.C. (2005). The Antiglobulin Test. Acedido em Jan. 6, 2014, disponível em: <http://www.dhbookpublishing.com/Portals/50/sample%20chapter%20-%20blood%20banking.pdf>

Hale, A. (2012). Canine blood groups and blood. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.), BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. (pp.280-283). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Hohenhaus, A.E. (2004). Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. Transfusion Medicine Reviews, 18(2), 117-126.

Hughes, D. (2011). Alvedia®: Transfusion Medicine. Acedido em Nov. 20, 2012, disponível em http://www.Alvedia.com/en/transfusion_medecine

IDEXX® (2014). Annual Screening for Vector-borne Disease: The SNAP® 4Dx® Plus Test Clinical Reference Guide. Acedido em Jan. 4, 2014. Disponível em: http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/smallanimal/snap/4dx/vbd-clinical-user-guide.pdf

Kessler, R.J., Reese, J., Chang, D., Seth, M., Hale, A.S., Giger, U. (2010). Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and Dal blood typing and cross-matching by gel column technique. Veterinary Clinical Pathology, 39, 306-316.

Kohn, B. & Weingart, C. (2012a). Feline transfusion medicine. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.). Eds.), BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. (pp.308-318). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Kohn, B., Classe, G., Weingart, C. (2012b). Clinical evaluation of the QuickVet/RapidVet canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood-typing test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3):539-545.

Lucidi, C.A., Takahira, R.K., Gerlach, J.A., Davis, J.M., Schwartz, K.A. (2011). Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 40(4), 435-443.

Marques, C.F.S. (2010). Frequência do antígeno eritrocitário DEA 1.1 em canídeos e dos antígenos eritrocitários A, B e AB em felídeos de Lisboa, Portugal. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Técnica de Lisboa

Mechanisms in Medicine (2010). The Antiglobulin Tests. Acedido em Dez. 20, 2013, disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=JWXC8yXe9dE>

Moldovan, M., Ognean, L., Arion, A., Morar, I. (2012). Testing blood pre-transfusion compatibility in a group of cats. *Annals of Romanian Society for Cell Biology*, 17(1), 154-158.

Nakage, A.P.M., Santana, A.E., Cápuia, M.L.B. & Coelho, P.S. (2005). Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia. *Veterinária.Ciência Rural*, 35, 966-973.

Nelson, M., Barrow, L.A., Poop, H., Gibson, J. (1995). Some observations on D antigen expression of D-positive and "weak D positive" red cells as assessed by flow cytometry. *Vox Sanguinis*, 69(2), 152-154.

RapidVet® (2014a) Major cross-match. Acedido em Dez. 10, 2013, disponível em: http://www.rapidvet.com/pdf/2013_x_major_card.pdf

RapidVet® (2014b) Major cross-match. Acedido em Dez. 10, 2013, disponível em: http://www.rapidvet.com/pdf/2013_x_minor_card.pdf

Rentko, V. (2012). Blood substitutes. In M. Day, B. Kohn (2nd ed.). Eds., *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp.319-323). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Ramsey, I. (2011). *BSAVA Small Animal Formulary* (7th ed). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Ribeiro, N.F.S. (2010). Relatório de estágio em citometria de fluxo. Dissertação de Mestrado em Oncologia. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Universidade do Porto.

Rozanski, E. (2009). Platelet rich plasma: it's more than you think! Peculiarities about feline transfusion medicine. *Proceedings of the 15th International Veterinary Emergency and Critical Care Society Conference*. Chicago, United States of America, 9-11 September.

Seth, M., Jackson, K.V., Winzelberg, S., Giger, U. (2012). Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *American Journal of Veterinary Research*, 73 (2), 213-219.

Snook, C. (2011). Alvedia®: Update on Neonatal Isoerythrolysis. Acedido em Nov. 20, 2012, disponível em http://alvedia.com/en/neonatal_isoerythrolysis_update

Swann, J.W., Skelly, B.J. (2013). Systematic Review of Evidence Relating to the Treatment of Immune-Mediated Hemolytic Anemia in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 1-9.

Tizard, I.R. (2000). *Veterinary Immunology: An Introduction*. (6th ed). Philadelphia: W.B. Saunders Company

Tocci, L.J. & Ewing, P.J. (2009). Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19 (1), 66-73.

Tocci, L.J. (2010). Transfusion medicine in small animal practice. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40 (3), 485-494.

Wardrop, K.J.(2007). New Red Blood Cell Antigens in Dogs and Cats—A Welcome Discovery. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 205–206.

Wardrop, K.J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., Lappin, M.R.(2005). Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 135-142.

Weinstein NM, Blais MC, Harris K, Oakley DA, Aronson LR, Giger U.(2007). A newly recognized blood group in domestic shorthair cats: the Mik red cell antigen. *Journal of Veterinary Internal Medicine*; 21(2):87-92.

Weinstein, N. M. (2010). Transfusion reactions. In D.J. Weiss & K.J. Wardrop (Eds.), *Schalm's veterinary hematology*. (6th ed). (pp. 769-775). Iowa: Wiley-Blackwell.

Weinstein, N.M., Sink, C.A.(2012). Blood typing and cross-matching. In Creedon, J.M.B., Davis, H. *Advanced Monitoring and Procedures for Small Animal Emergency and Critical Care*. (pp. 682-692). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Wilkerson, M.J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42, 53-71.

Wu, X.Y., XU, H.X., Shiong, W., Shao, C.P.(2013). Detection of weak D antigen by flow cytometry. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 21(2), 474-473.

IV- Anexos

Anexo 1. Tabela explicativa acerca do procedimento de um cross-match em tubo

Procedimento de um cross-match em tubo

1. Colher uma amostra de sangue do recetor e possível dador para um tubo EDTA. No caso do possível dador pode-se colher uma amostra do saco de colheita e colocar num tubo seco.
2. Centrifugar os tubos a 9000 rpm durante 5 minutos para separar o plasma dos eritrócitos.
3. Remover o plasma de cada amostra com uma pipeta limpa e transferir para um tubo propriamente identificado.
4. Lavar os eritrócitos algumas vezes com solução salina isotónica e fazer uma suspensão com 3% a 5% de eritrócitos(aproximadamente 1 gota de concentrado eritrocitário para 20 gotas de solução salina
5. Para cada dador preparar 3 tubos identificados como Major, Minor e controlo do recipiente. Para cada adicionar 2 partes de plasma para uma parte de suspensão de eritrócitos como indicado seguidamente:

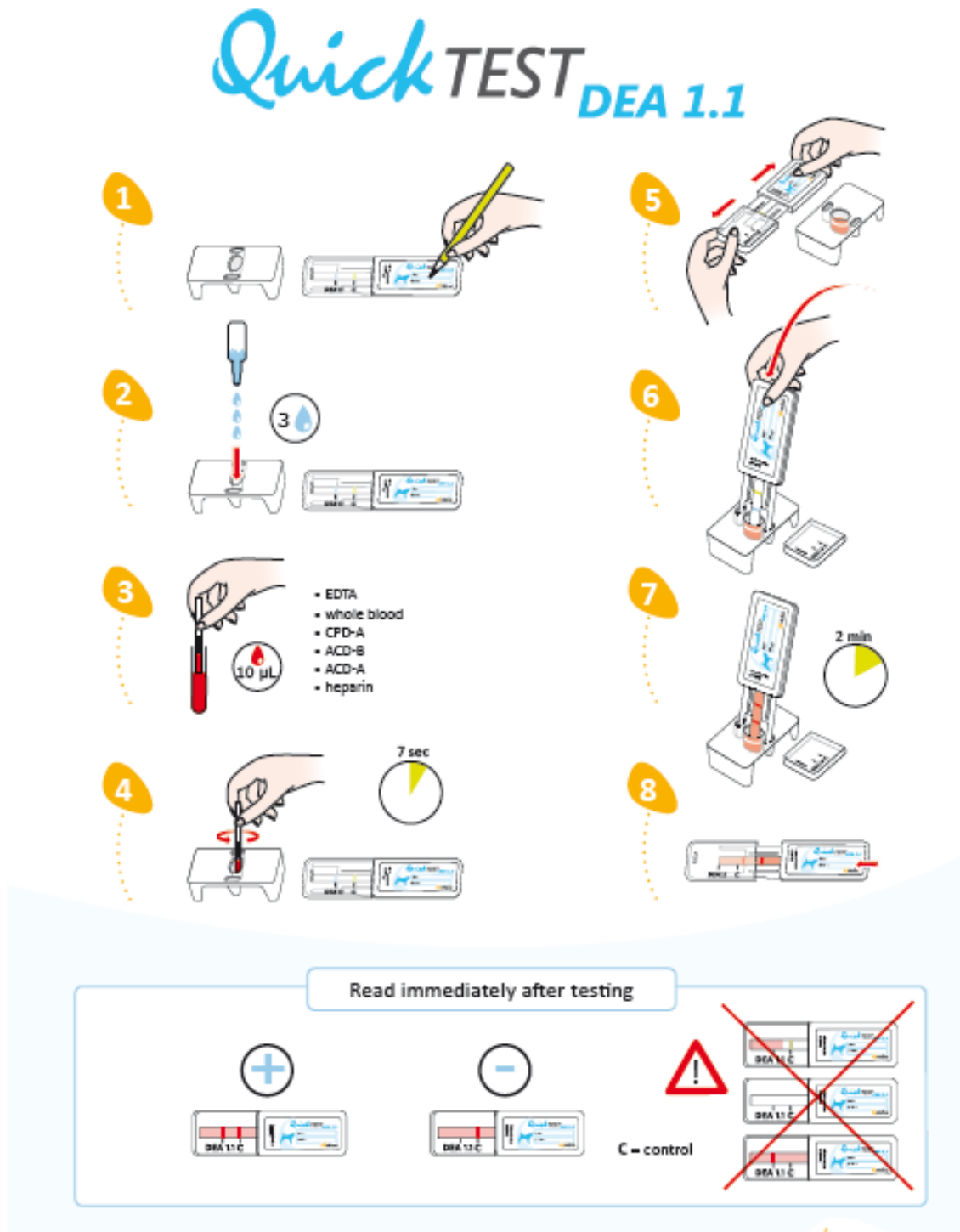
Major cross-match: Plasma do recetor com eritrócitos do dador

Minor cross-match: Plasma do dador com eritrócitos do recetor

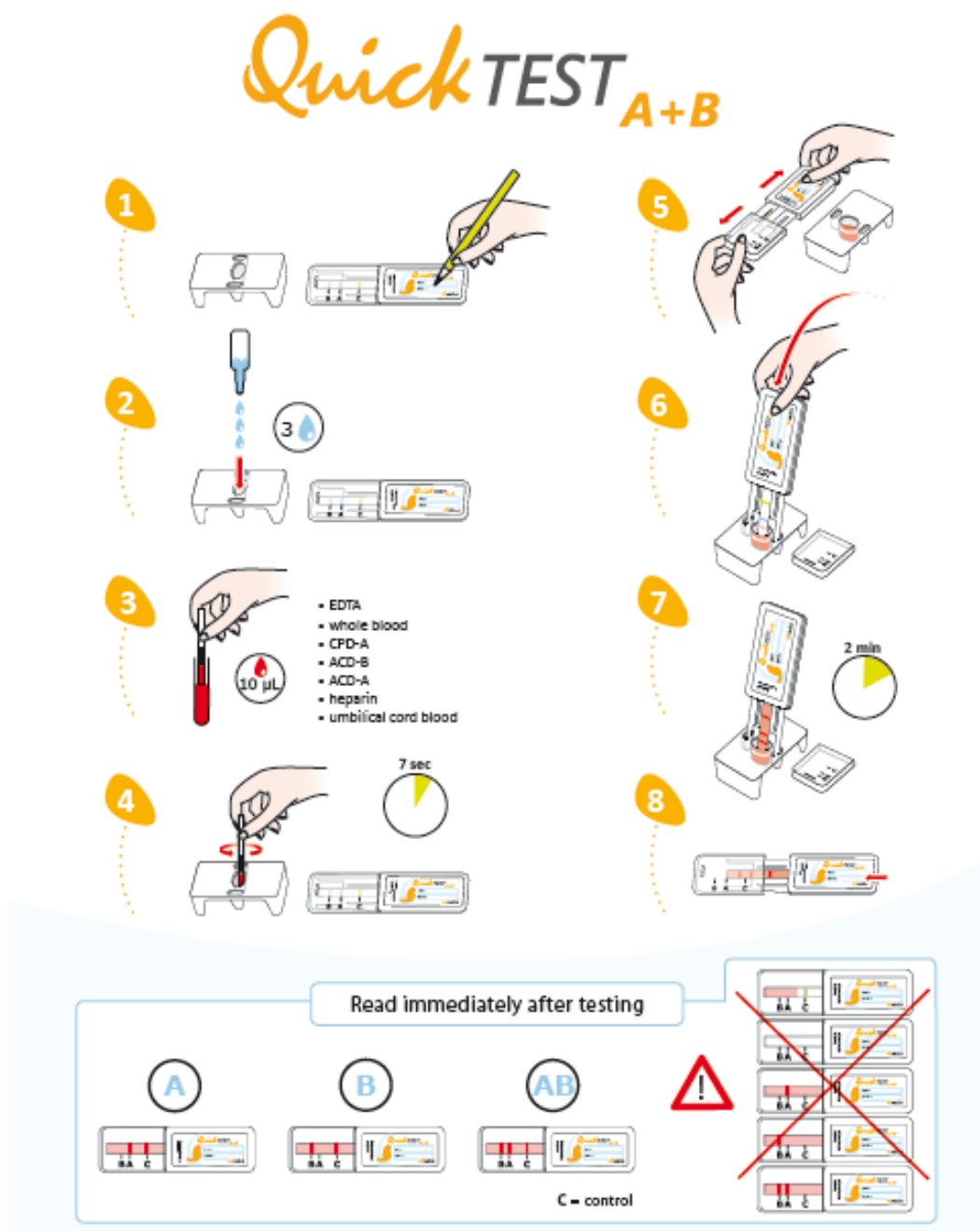
Controlo do recetor: Plasma do recetor com eritrócitos do recetor

6. Misturar suavemente e deixar incubar durante 15 minutos a uma temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 15 segundos a 9000rpm
8. Examinar o sobrenadante para ver se há hemólise
9. Mexer gentilmente o tubo ou bater levemente com o dedo para ver se há aglutinação macroscópica
10. Se não for observada aglutinação macroscópica, transferir uma pequena quantidade para uma lâmina e observar ao microscópio.

Anexo 2. Esquema sobre a utilização do Quick Test DEA 1.1®



Anexo 3. Esquema sobre a utilização do Quick Test A+B®



Anexo 4. Protocolo de citometria utilizado neste projeto.

Protocolo da Citometria de fluxo - Alvedia ® - Dianov ®

1. Lavar o sangue com tampão fosfato salino, em inglês *phosphate buffered saline* (PBS) a uma velocidade de 2300 rpm durante 3 minutos. Se a amostra foi mais antiga repetir o processo várias vezes.
2. Fazer uma suspensão a 10% (10 µl de eritrócitos lavados com 90µl de PBS).
3. Diluição de 1:2 de PBS com anticorpos anti DEA 1 (sobrenadante).
4. Adicionar 10 µl de suspensão de eritrócitos com 100 µl de anticorpos anti DEA 1.
5. Incubar 30 minutos a 37°C.
6. Lavar uma vez em PBS a 2300 rpm por 3 minutos.
7. Adicionar os anticorpos secundários anti-ratinho acoplados ao FITC (20 µl numa diluição de 1:20 em PBS).
8. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
9. Lavar uma vez em PBS a 2300rpm durante 3 minutos.
10. Adicionar 500 µl de PBS e transferir para os tubos de citometria.

Anexo 5. Esquema sobre a utilização do SNAP® 4DX® plus test.



1.

Transferir 3 gotas de amostra e 4 gotas de reagente para um tubo.



2.

Mexer suavemente o tubo 4 a 5 vezes para misturar.



3.

Colocar todo o conteúdo do tubo para o poço do dispositivo SNAP®.



4.

Quando aparece uma coloração diferente no círculo de ativação pressionar o dispositivo com firmeza até ouvir um estalido.



5.

Ler os resultados do teste 8 minutos após ativação.

→Circulo azul na zona dos resultados corresponde a resultado positivo

Anexo 6. Evolução do hemograma no paciente Adjy.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	1,1	9,1	3,1	8,8	9,9
Controlo 24h	2,1	15,2	3,1	1,7	15,9
Controlo 24h T2	2,36	11,4	4	2,6	13,3
Controlo 24h T3	3,8	29,3	10	0,6	14,79
Controlo 1-2 m	6,83	46,9	16	0,8	12,9
Pré transfusão T4	1,6	12	4,3	7,8	17,84
Controlo 24h T5	6,29	46	14	0,1	13,93

Legenda: h-horas; m-meses; T2-segunda transfusão; T3- terceira transfusão; T4- quarta transfusão; T5- quinta transfusão.

Anexo 7. Evolução do hemograma no paciente Alcane.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	5,62	39	13	nd	16,5
Controlo 24h	3,2	22	7,7	1,1	21,4

Legenda: h-horas; nd- não disponível.

Anexo 8. Evolução do hemograma no paciente Angelle.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	0,83	16	4,8	22,7	14,2
Controlo 24h	1,2	10	7,2	17,2	13,92
Controlo 1-2m	5,95	49	16	1,3	8

Legenda: h-horas; m-meses.

Anexo 9. Evolução do hemograma do paciente Chipie.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	2,69	18	6,8	6,8	27,32
Controlo 24h	3,3	22	7,5	1,4	38,2

Legenda: h-horas.

Anexo 10. Evolução do hemograma do paciente Dona.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	0,6	4	3,4	30	35,6
Controlo 24h	2,09	16	5,8	3,8	27
Controlo 24h T2	2,2	17	6,2	11,2	28,5
Controlo 1-2m	nd	34	11	3,8	28,5

Legenda: h-horas; m-meses;T2-segunda transfusão.

Anexo 11. Evolução do hemograma do paciente Fera.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	4,36	29	10	nd	14,4
Controlo 24h	4,58	31	11	0	13,1
Controlo 1-2m	7,44	52	18	1	9,89

Legenda: h-horas; m-meses;nd- não disponível.

Anexo 12. Evolução do hemograma do paciente Krants.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	7,9	56	nd	nd	nd
Controlo 1-2m	7,44	52	18	1	9,89

Legenda: h-horas; m-meses;nd- não disponível.

Anexo 13. Evolução do hemograma do paciente Lilou.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	3,86	31	10	0,2	9,3
Controlo 24h	3,4	20	6,7	0,3	19,2

Legenda: h-horas.

Anexo 14. Evolução do hemograma do paciente Molly.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	2,37	16	5,4	2,9	15,8
Controlo 24h	2,9	20	8,3	9,9	19,62

Legenda: h-horas.

Anexo 15. Evolução do hemograma do paciente Pourquoi.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	4,21	27	9,6	0	12,7
Controlo 24h	3,7	23	8,3	0	6,6

Legenda: h-horas.

Anexo 16. Evolução do hemograma do paciente Sacha

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	1,5	11	3,8	3,5	19,54
Controlo 24h(T1+T2+T3)	2,59	19	7,3	2,8	24,72
Controlo 24h T4	3,34	nd	8,3	6,2	40,5
Controlo 24h T5	4,31	31	12	3	48,48
Controlo 1-2m	4,72	35	13	1,5	10,5

Legenda: h-horas; m-meses; T1-primeira transfusão; T2-segunda transfusão; T3- terceira transfusão; T4-quarta transfusão; T5- quinta transfusão; nd- não disponível.

Anexo 17. Evolução do hemograma do paciente Tosca.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	4,62	35	13	2,1	13,9
Controlo 24h	3,2	21	7,4	2,3	9,4

Legenda: h-horas.

Anexo 18. Evolução do hemograma do paciente Ulys.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	0,9	nd	2,9	4,3	9,4
Controlo 24h	3,5	27	9,2	nd	36,2
Controlo 24h T2	5,7	38	13	3	48,2

Legenda: h-horas; T2-segunda transfusão; nd- não disponível.

Anexo 19. Evolução do hemograma do paciente Ulysse C.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	2,24	16	4,9	0,013	8,26
Controlo 24h	3,51	26	9,7	0,5	12,97
Controlo 24h T2	1,51	12	4,6	2,1	16,68
Controlo 24h T3	2,87	26	8,8	9,2	14,4
Controlo 1-2m	6,37	42	14	0,7	11,36

Legenda: h-horas; m-meses; T2-segunda transfusão; T3- terceira transfusão.

Anexo 20. Evolução do hemograma do paciente Ulysse L.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	2,78	16	5,2	12,7	15,5
Controlo 24h	2,7	16	5,5	13,2	16

Legenda: h-horas.

Anexo 21. Evolução do hemograma do paciente Voltaire.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	1	7,6	5,4	0,017	31,93
Controlo 24h	nd	nd	6,1	6,3	43,85
Controlo 24h T2	1,69	13	4,6	8	27,6
Controlo 1-2m	5,14	40	15	8	18,87

Legenda: h-horas; m-meses;T2-segunda transfusão; nd- não disponível.

Anexo 22. Evolução do hemograma do paciente Yerrine.

	Eritrócitos (x10 ¹² /L) Ref: (5,5-8,5)	Hematócrito (%) Ref: (37-55)	Hemoglobina (g/dL) Ref: (12-18)	Reticulócitos (%)	Leucócitos (x10 ⁹ /L) Ref: (5,5-16,9)
Pré transfusão	nd	27	nd	nd	nd
Controlo 24h	4,38	30	10	0,3	27,2

Legenda: h-horas;nd- não disponível.